

María Sancho Albero

Vehículos híbridos formados por
exosomas y nanopartículas.
Aplicaciones en terapia y
diagnóstico del cáncer.

Director/es

Santamaría Ramiro, Jesús
Martín Duque, María del Pilar

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

VEHÍCULOS HÍBRIDOS FORMADOS POR
EXOSOMAS Y NANOPARTÍCULAS. APLICACIONES
EN TERAPIA Y DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER.

Autor

María Sancho Albero

Director/es

Santamaría Ramiro, Jesús
Martín Duque, María del Pilar

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Ingeniería Química y del Medio Ambiente

2020

TESIS DOCTORAL

**Vehículos híbridos formados
por exosomas y nanopartículas.
Aplicaciones en terapia y
diagnóstico del cáncer**

María Sancho Alberro

Diseño de la portada:
María Sancho y Víctor Sebastián



Universidad
Zaragoza

Vehículos híbridos formados por exosomas y nanopartículas. Aplicaciones en terapia y diagnóstico del cáncer

Autor

María Sancho Albero

Directores

Jesús Santamaría Ramiro

María del Pilar Martín Duque

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente

2020

El Prof. Jesús Santamaría Ramiro, catedrático del Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza y la Dra. María del Pilar Martín Duque, investigadora Araid del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud,

CERTIFICAN:

Que la memoria de Tesis Doctoral titulada: ***“Vehículos híbridos formados por exosomas y nanopartículas. Aplicaciones en terapia y diagnóstico del cáncer”***, ha sido realizado por Dña. María Sancho Albero bajo su supervisión en el Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA), y en el Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza. En consecuencia, autorizan la presentación de la misma.

Y para que conste, firmamos la presente Certificación en Zaragoza a 20 de octubre del 2020.

Prof. Jesús Santamaría Ramiro

Dra. María del Pilar Martín Duque

A ti, papá

***“Si he visto más lejos es porque estoy sentado sobre
los hombros de gigantes”***

Isaac Newton, 1676

AGRADECIMIENTOS

Aunque el periodo de Tesis Doctoral esté comprendido entre los años 2016 y 2020, mi vinculación al INA se remonta al año 2013...¿Qué será eso del INA? ¿Qué será eso de la nanotecnología? Pero si yo estoy estudiando Biotecnología...¿Qué pinto yo en el mundo de la Ingeniería? Me pregunté...

Todavía recuerdo los inicios, cuando una mañana de verano de 2013 (yo estaba en tercero de carrera) fui a conocer el INA, y aunque no sabía muy bien a que me quería dedicar en el futuro, parecía que allí se estudiaban cosas interesantes.... Fue entonces cuando conocí los laboratorios y los estudios que realizaban en el grupo NFP “¡qué bonito tiene que ser investigar sobre las propiedades de estos nanomateriales en el mundo *bio!*”. Como dijo Marie Curie, “*Era como un nuevo mundo abierto para mí, el mundo de la ciencia, que por fin se me permitió conocer en total libertad.*” Ese verano (2013) lo pasé de prácticas, y lo encadené haciendo mi TFG hasta el año 2014. Un año más tarde (septiembre de 2015) defendí mi TFM, gracias Jesús, Marimar, Manuel y Gracia por formarme y guiarme en mis primeros pasos en el mundo de la investigación. Ese mismo año, la curiosidad sobre el estudio de esta ciencia antes desconocida para mí, se acentuó gracias al entusiasmo de Jesús, quien me habló de una tal Pilar Martín, que colaboraba con el grupo estudiando la aplicación de los nanomateriales para el tratamiento del cáncer (¡esto sí que me gusta!, pensé...).

Estos fueron mis primeros pasos, ya tenía mucha gente a la que agradecer la pasión transmitida y las oportunidades ofrecidas antes de empezar el periodo de Tesis Doctoral ¡Gracias a todos!

Esta Tesis ha sido posible gracias a mucha gente, pero sin duda, especialmente a mis directores Jesús y Pilar. Gracias Jesús, por abrirme las puertas de tu grupo y por confiar en mí desde el primer día. Me alegra mucho haber compartido estos años con un gran científico, pero sobretodo con una gran persona como tú. Gracias por regalarme generosamente mucho de lo que sabes; por tu gran implicación y por tu entusiasmo con esta Tesis Doctoral. A Pilar, sin tu inestimable ayuda, esto no hubiera sido posible. Gracias infinitas por todo tu conocimiento, esfuerzo, interés y ayuda. Tu apoyo y tiempo invertidos han sido fundamentales. Gracias por aprender de ti “pipeta en mano”, como tanto te gusta y por darme la oportunidad de acudir a congresos y conocer a grandes científicos. ¡Tus *polluelas* te estaremos siempre agradecidas! Además de mis directores de Tesis, sois grandes amigos. Gracias a ambos por todo lo que me habéis enseñado estos años, no solo en el ámbito académico (que ha sido mucho), sino también en lo personal. Por estar ahí, respetarme y apoyarme en los momentos más difíciles

acontecidos en este periodo... ¡Os estaré eternamente agradecida! Por cierto, seguiré llevando una torta de tomate de Leciñena el día de mi cumpleaños pasillo del NFP...

Agradecer también a Manuel todo tu conocimiento y tu indispensable ayuda para sacar adelante todos los trabajos realizados a lo largo de estos años. Gracias Víctor, por estar siempre dispuesto a ayudarme, por ser mis ojos para analizar nanopartículas y exosomas, por adentrarnos juntos en el mundo de la microfluídica, de los exosomas y del monóxido de carbono, que tantos frutos nos ha dado y tanto hemos disfrutado, (¡ah, y gracias por la portada!) ... Gracias por tenderme vuestra mano, sin duda esta Tesis tiene mucho de vosotros.

Ha sido un enorme placer compartir estos años con el increíble grupo de gente que constituye el grupo NFP. Agradecer vuestra amistad, vivencias y simpatía a lo largo de estos años, no podría haber tenido unos compañeros mejores. Gracias a todos los doctores, Gema, Reyes, Pili, Silvia, José Luis, Nacho, Carlos, Teresa, Paco, Pilar L., Laura, María B., Javi, Emilio y por supuesto Nuria (sin ti, el laboratorio no sería lo que es). Gracias a Fer y Cristina, por las noches de *Sidrería* y *Brasil* compartidas, no hubiera sido lo mismo sin vosotros. Sara, Bea, Guille y Kike, ha sido genial teneros como compañeros de despacho. Gracias Marta, por contagiarnos mutuamente nuestro entusiasmo por la ciencia. Gracias Roberta por mantener siempre el italiano vivo en mí. Gracias también a los recientemente incorporados, Miguel, Arturo, Ainhoa, Cristóbal, Nacho, Javi, Gabriela y Ana “*pequeña*”. Ana “*mayor*”, gracias por compartir conmigo y ayudarme en la fase final de mi Tesis, ¡el laboratorio está en las mejores manos! También me gustaría agradecer a todos los compañeros que tomaron otro camino y que me ayudaron en mis inicios: Ana, Javi, Ane, Hakan, Diego, Alberto, Isabel, Vanesa, Nuria, Martín, Iván y Rebeca. Y perdonad si me olvido a alguien. Por último, gracias a una de las cosas más importantes que me llevo de este periodo: grandes amigas. Gracias a “*Las Maris*” (MM y MC), por apoyarme todo este tiempo, por vuestra ilusión y por compartir tantos momentos dentro y fuera del laboratorio. Nos seguiremos acompañando allí donde vayamos... Gracia, gracias por quererme con mi locura propia, por ser mi apoyo incondicional todos estos años, por apoyarme siempre profesional y personalmente. Eres una de esas personas que todo el mundo quiere tener en su vida. Te debo muchas cosas.

También quiero agradecer a Pilar Sánchez por ayudarme siempre con toda la documentación y calmarme mis agobios con los trámites burocráticos. Gracias también a Marta Giménez, por ser pieza fundamental en el grupo y facilitarnos nuestro trabajo cada día, gracias por hacerme partícipe de los proyectos de divulgación científica, me ha encantado participar en ellos. Sin duda, gracias también a mis profesores y

compañeros de docencia, en especial Javi Ábrego, Rosa Matute, Alicia y Cris (¡tenemos un sushi pendiente!).

Gracias a todas esas personas que me ido cruzando en este camino: Pili Mozas, los chicos del ICB (Vicente, Luis y Carmen, ¡nos quedan experimentos pendientes!), Leire (nos conocimos en el instituto y la ciencia nos ha reencontrado), chicas del grupo de Fisiopren (Laura M., Natacha, Alodia y Pilar)...

Sin duda, una de las mejores experiencias de este periodo de Tesis han sido las estancias de investigación que he realizado en dos grupos excepcionales. *Grazie mille al Prof. Pierangelo Metrangolo e alla Prof. Francesca Baldelli del Politécnico de Milano per aprirmi le porte del vostro laboratorio SupraBioNanoLab e imparare con voi i composti superfluorinati e la chimica soprabiomolecolare. Thank you Nazeeha for your help and hospitality in the lab and all good moments spent during my lab stay, it has been a pleasure knowing you (we still have to travel around India and Spain!). I also would like to thanks Prof. Andrew deMello and Dr. Stravros Stravrakis from the ETH of Zurich for giving me the opportunity of expanding my training and knowledge in the field of the microfluidics. It was a great experience what I lived during those months.*

No quisiera olvidarme de los Servicios Científico Técnicos del IACS, por su ayuda en el desarrollo de este trabajo: David y Alejandro (SCT de Cultivo Celular), Javier (SCT de Separación Celular y Citometría), Amparo (SCT de Anatomía Patológica), Irene y Giuseppe (SCT de Proteómica) y a los chicos del SCT de Animalario (Elena, Silvia, Pilar, Cristian y José Luis, gracias por vuestra inestimable ayuda con los experimentos con animales en el último periodo de esta Tesis). Sin duda a los que más tengo que agradecer es a César y María (SCT de Microscopía e Imagen), gracias las infinitas sesiones de microscopía, no sólo me habéis formado profesionalmente en este ámbito, sino que además me habéis contagiado vuestra pasión por los “confocales”. Ya sabes César, siempre hay por ahí alguien de Leciñena dispuesto a dar guerra... Quién sabe, ¡quizá nos reencontremos en las próximas Fiestas de septiembre!

Me gustaría agradecer también al Prof. Asier Unciti Broceta, Ana y Belén por compartir conmigo uno de los proyectos más apasionantes de esta Tesis, ¡hemos formado un gran equipo! Gracias también a los chicos del CICbiomaGUNE Ainhoa y Daniel, y al Prof. Jesús Ruiz Cabello, por vuestra ayuda con los frenéticos experimentos de imagen por resonancia magnética con los animales. He de agradecer profundamente al Dr. Lluís Luján y todo su equipo por vuestra ayuda en el análisis histopatológico de las muestras extraídas de los ratones, gracias por estar siempre dispuestos a enseñarme un poquito de vuestro mundo. Por último, infinitas gracias al Dr. Javier Sesé

del INMA y al Dr. Roberto Pazo del Hospital Universitario Miguel Servet por acercar nuestra investigación a la clínica. En especial, GRACIAS a todos los pacientes oncológicos que donaron sus muestras para poder hacer realidad este proyecto tan ilusionante, y a la vez, tan necesario.

A mis todos mis amigos (en especial Jorge, Carlos, Irene, Teresa y las chicas Erasmus), gracias por vuestra inquietud y preocupación sobre mis locuras por la ciencia. Siempre os estaré eternamente agradecida por creer en mí como investigadora (aunque algunos creáis que sólo me dedico a jugar con células). Marina, gracias por apoyarme incansablemente en las buenas, pero sobretodo, en los malos momentos, te seguiré incondicionalmente allá donde vayas. Sin duda, esto ha seguido hacia delante gracias a vuestro apoyo. ¡No puedo tener unos amigos mejores! A las *Enigma* por acompañarme siempre y, aunque creo que algunas no saben muy bien a lo que me he estado dedicando estos años, gracias por preguntar, mostrar interés y acompañarme en esta etapa. Que voy a deciros que no sepáis, ¡gracias por vuestro apoyo y cariño a lo largo de todos estos años, sois únicas! Ah, y gracias por hacerme más llevadera la escritura de la Tesis durante el confinamiento (¡Y por ayudarme en mis atascos semánticos... ¿*Sustantivo de inocuo, de inerte*...?! Gracias también a esos chicos que investigan con las piedras (Mikel, Ana, María y Anchel). En especial, a ti, chaval...!! Gracias, Miguel, por tantas cosas indescriptibles, has sido (y serás) pieza clave en nuestra vida estos últimos años, siempre habrá una energía que nos una, y alguien muy orgulloso de ello. Por cierto, nos debéis una subida al Monte Perdido.

Y como no, gracias Javi, ajeno a este mundo, pero tu apoyo ha sido esencial para llegar hasta aquí. Gracias por acompañarme y hacerme mejor cada día. Gracias por creer en mi de manera incondicional y por estar siempre ahí, en los buenos y en los malos momentos. Te has convertido en todo un experto en *exosomas*...

Por último, gracias a toda mi familia (abuelos, primos y tíos) por los ánimos. En especial, mamá y papá, gracias por vuestros valores y disciplina, por acompañarme en este camino, apoyarme día tras día y creer en mi. Mamá, gracias por ser siempre mi principal apoyo incondicional, gracias por enseñarme a buscar aquello que me haga feliz para poder cumplir mis sueños y por transmitirme la ilusión por las pequeñas cosas de la vida. Papá, se que desde algún lugar me llevas de la mano para que logre ser feliz. Gracias por contagiarme la pasión por la ciencia y por la investigación y por hacer de mi trabajo mi mayor hobby. Tú has sido mi mayor motor cada día de este periodo de Tesis Doctoral, la he disfrutado al máximo, tal y como tu me inculcaste.

¡Gracias a todos!

	Páginas
Glosario de abreviaturas	XI
Resumen	XVII
Summary	XXIII
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. El cáncer	5
1.1.1. El cáncer en cifras	5
1.1.2. Conceptos básicos sobre el cáncer	5
1.2. La nanotecnología y la nanomedicina	7
1.2.1. Aplicaciones de la nanomedicina	9
1.3. Tratamientos convencionales del cáncer vs terapias avanzadas	11
1.3.1. La nanomedicina aplicada al tratamiento del cáncer	12
1.4. Los exosomas	19
1.4.1. Definición, composición, biogénesis y funciones	19
1.4.2. Exosomas y cáncer	24
1.4.3. Exosomas como vectores de terapia y agentes de imagen y diagnóstico	26
1.5. Combinación de exosomas y nanotecnología	28
2. OBJETIVOS	37
3. MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1. Caracterización de las NPs	43
3.1.1. DLS y potencial zeta	43
3.1.2. XPS	44
3.1.3. ICP-MS	44
3.1.4. MP-AES	45
3.1.5. FTIR	46
3.1.6. TGA	46
3.1.7. Espectrofotometría UV-VIS	47
3.1.8. TEM	47
3.2. Líneas celulares	48
3.2.1. Mantenimiento de los cultivos celulares	48
3.2.2. Congelación y descongelación de células	49
3.3. Determinación de la citotoxicidad de las nanopartículas	50
3.3.1. Análisis de citotoxicidad metabólica	50
3.3.2. Ensayo LIVE/DEAD	51
3.3.3. Análisis de las fases del ciclo celular	51
3.4. Evaluación de la internalización de las nanopartículas	53
3.4.1. Inmunocitoquímica y microscopía confocal	53
3.4.2. MP-AES	55

3.5. Aislamiento de exosomas por ultracentrifugación	55
3.5.1. Obtención del medio ULTRACEN	55
3.5.2. Aislamiento de exosomas de cultivos celulares	56
3.6. Caracterización de los exosomas	56
3.6.1. Cuantificación de proteína total por BCA	57
3.6.2. TEM	57
3.6.3. Análisis de proteínas por WB	58
3.6.4. NTA	60
3.6.5. DLS y potencial zeta	61
3.6.6. Microscopía confocal: co-localización con NPs	61
3.7. Modelos animales de experimentación	61
3.8. Análisis estadístico	62
 4. <u>ENCAPSULACIÓN DE NANOPARTÍCULAS EN EL INTERIOR DE EXOSOMAS. MÉTODOS EXÓGENOS E INCUBACIÓN CON CÉLULAS PARENTALES</u>	 67
4.1. Introducción	67
4.2. Encapsulación de HGNs y PEG-HGNs en exosomas de células B16-F10	73
4.2.1. Experimental	73
4.2.1.1. <i>Síntesis de HGNs y PEG-HGNs y determinación de su estabilidad</i>	
4.2.1.2. <i>Métodos de encapsulación forzada</i>	
4.2.1.3. <i>Captación natural: incubación de PEG-HGNs con células B16-F10</i>	
4.2.1.4. <i>Aislamiento y caracterización de exosomas con PEG-HGNs</i>	
4.2.1.5. <i>Estudio de la ruta de secreción exosomal</i>	
4.2.1.6. <i>Evaluación de la estabilidad de los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10}</i>	
4.2.2. Resultados y discusión	82
4.2.2.1. <i>Caracterización de las HGNs y PEG-HGNs</i>	
4.2.2.2. <i>Evaluación de la estabilidad de HGNs y PEG-HGNs</i>	
4.2.2.3. <i>Caracterización de exosomas derivados de células B16-F10</i>	
4.2.2.4. <i>Eficacia de la encapsulación por métodos de carga forzada</i>	
4.2.2.5. <i>Encapsulación de HGNs y PEG-HGNs mediante captación natural</i>	
4.2.3. Conclusiones de esta sección	101
4.3. Encapsulación de HGNs y PEG-HGNs en Exos^{hpMSCs}: vectores específicos con selectividad celular	102
4.3.1. Experimental	102
4.3.1.1. <i>Ensayos de toxicidad, ciclo celular e internalización celular</i>	
4.3.1.2. <i>Exosomas como vectores selectivos de PEG-HGNs</i>	
4.3.2. Resultados y discusión	105
4.3.2.1. <i>Caracterización de Exos^{hpMSCs}</i>	
4.3.2.2. <i>Ensayos de viabilidad y de internalización celular</i>	
4.3.2.3. <i>Incorporación de las PEG-HGNs en Exos^{hpMSCs}</i>	
4.3.2.4. <i>Exos^{hpMSCs} como vectores selectivos de PEG-HGNs</i>	
4.3.3. Conclusiones de esta sección	119

4.4. Encapsulación de <i>Perfecta</i> en el interior de exosomas tumorales B16-F10 y de células madre derivadas de médula ósea	120
4.4.1. Experimental	120
4.4.1.1. <i>Síntesis y caracterización de la emulsión de Perfecta con lecitina</i>	
4.4.1.2. <i>Ensayos de citotoxicidad e internalización</i>	
4.4.1.3. <i>Aislamiento y caracterización de Perfecta-Exos</i>	
4.4.1.4. <i>Análisis de la estabilidad de los Perfecta-Exos</i>	
4.4.2. Resultados y discusión	122
4.4.2.1. <i>Caracterización de la emulsión de Perfecta con lecitina</i>	
4.4.2.2. <i>Ensayos de citotoxicidad metabólica y de internalización celular</i>	
4.4.2.3. <i>Caracterización de los Perfecta-Exos</i>	
4.4.2.4. <i>Evaluación de la estabilidad de los Perfecta-Exos</i>	
4.4.3. Conclusiones de esta sección	130
5. <u>GENERACIÓN IN SITU DE NANOPARTÍCULAS EN EL INTERIOR DE EXOSOMAS MEDIANTE REDUCCIÓN EN ATMÓSFERA DE MONÓXIDO DE CARBONO</u>	137
5.1. Introducción	137
5.2. Experimental	141
5.2.1. Purificación de exosomas de cultivos celulares	141
5.2.2. Incubación de los exosomas con los precursores metálicos	141
5.2.3. Generación de los nanomateriales por reducción con CO	142
5.2.4. Caracterización de los exosomas con las nanoestructuras en su interior	144
5.2.5. Evaluación de la estabilidad de los exosomas	144
5.3. Resultados y discusión	144
5.3.1. Caracterización de Pd-Exos	144
5.3.2. Caracterización de los Au-Exos	155
5.3.3. Caracterización de los Pt-Exos	161
5.4. Conclusiones	165
6. <u>EXOSOMAS Y NANOPARTÍCULAS COMO AGENTE DE IMAGEN Y DIAGNÓSTICO</u>	171
6.1. Introducción	171
6.2. Microdispositivo para el aislamiento de exosomas de sangre periférica de pacientes con CP	173
6.2.1. Experimental	177
6.2.1.1. <i>Síntesis de Fe₃O₄NPs y Fe₃O₄-EDC-NHS-NPs</i>	
6.2.1.2. <i>Evaluación de la estabilidad de las MNPs</i>	
6.2.1.3. <i>Unión del anticuerpo anti-CD9 a las MNPs</i>	
6.2.1.4. <i>Fabricación y principio de operación del microdispositivo</i>	
6.2.1.5. <i>Captura de los exosomas</i>	
6.2.1.6. <i>Preparación de las muestras de PBS, FBS y sangre</i>	

6.2.1.7.	<i>Inmunocaptura de los exosomas en el microdispositivo</i>	
6.2.1.8.	<i>ELISA CA19-9 de los exosomas capturados</i>	
6.2.2.	Resultados y discusión	185
6.2.2.1.	<i>Caracterización de las Fe₃O₄NPs y Fe₃O₄-EDC-NHS-NPs</i>	
6.2.2.2.	<i>Evaluación de la estabilidad de Fe₃O₄NPs y Fe₃O₄-EDC-NHS-NPs</i>	
6.2.2.3.	<i>Unión de anti-CD9 a las MNPs</i>	
6.2.2.4.	<i>Prueba de concepto de la captura de exosomas</i>	
6.2.2.5.	<i>Captura de exosomas en el microdispositivo</i>	
6.2.3.	Conclusiones de esta sección	199
6.3.	PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} para seguimiento y visualización de células en cultivo	200
6.3.1.	Experimental	200
6.3.1.1.	<i>PEG-HGNs-Exos para seguimiento celular por microscopía confocal</i>	
6.3.1.2.	<i>Visualización de PEG-HGNs en tejido muscular ex vivo</i>	
6.3.2.	Resultados y discusión	201
6.3.2.1.	<i>PEG-HGNs-Exos para seguimiento celular por microscopía confocal</i>	
6.3.2.2.	<i>Visualización PEG-HGNs en tejido muscular ex vivo</i>	
6.3.3.	Conclusiones de esta sección	203
6.4.	Exosomas cargados con <i>Perfecta</i> para imagen por ¹⁹F-MRI	203
6.4.1.	Experimental	204
6.4.1.1.	<i>Imagen ¹⁹F-MRI ex vivo</i>	
6.4.1.2.	<i>Citotoxicidad metabólica</i>	
6.4.1.3.	<i>Visualización en cultivos celulares por microscopía confocal</i>	
6.4.1.4.	<i>¹⁹F-MRI in vivo</i>	
6.4.2.	Resultados y discusión	207
6.4.2.1.	<i>Imagen ¹⁹F-MRI ex vivo</i>	
6.4.2.2.	<i>Citotoxicidad de los <i>Perfecta</i>-Exos</i>	
6.4.2.3.	<i>Visualización en cultivos celulares por microscopía confocal</i>	
6.4.2.4.	<i>¹⁹F-MRI in vivo</i>	
6.4.3.	Conclusiones de esta sección	210
7.	<u>COMBINACIÓN DE EXOSOMAS Y NANOPARTÍCULAS COMO HERRAMIENTA ANTITUMORAL IN VITRO</u>	217
7.1.	Introducción	217
7.2.	Pt-Exos derivados de células U251 y hpMSCs	220
7.2.1.	Experimental	222
7.2.1.1.	<i>Aislamiento y caracterización de exosomas y preparación de los Pt-Exos</i>	
7.2.1.2.	<i>Citotoxicidad metabólica por Alamar Blue y microscopía convencional</i>	
7.2.1.3.	<i>Microscopía de fluorescencia y ensayo LIVE/DEAD</i>	

7.2.1.4.	<i>Citometría de flujo y muerte selectiva: ciclo celular y necrosis/apoptosis</i>	
7.2.2.	Resultados y discusión	224
7.2.2.1.	<i>Caracterización de exosomas y preparación de los Pt-Exos</i>	
7.2.2.2.	<i>Citotoxicidad metabólica y microscopía convencional</i>	
7.2.2.3.	<i>Microscopía de fluorescencia y ensayo LIVE/DEAD</i>	
7.2.2.4.	<i>Citometría de flujo: evaluación del ciclo celular y de la necrosis/apoptosis</i>	
7.2.3.	Conclusiones de esta sección	230
7.3.	Pd-Exos^{A549} como catalizadores bioortogonales	231
7.3.1.	Experimental	233
7.3.1.1.	<i>Aislamiento, caracterización de exosomas y preparación de los Pd-Exos</i>	
7.3.1.2.	<i>Síntesis del sensor 1 y la prodroga 4</i>	
7.3.1.3.	<i>Evaluación de la biocompatibilidad de los Pd-Exos</i>	
7.3.1.4.	<i>Estudio de internalización celular de Pd-Exos por microscopía confocal</i>	
7.3.1.5.	<i>Toxicidad de las moléculas 3 y 4 en células A549 y U87-MG</i>	
7.3.1.6.	<i>Estudio de la posible sinergia entre la molécula 3 y los Pd-Exos</i>	
7.3.1.7.	<i>Activación del profármaco intracelularmente en células A549</i>	
7.3.1.8.	<i>Actividad catalítica de los Pd-Exos^{A549} vs Pd-Exos^{U87-MG}</i>	
7.3.1.9.	<i>Ensayo de competición</i>	
7.3.2.	Resultados y discusión	236
7.3.2.1.	<i>Espectros fluorescentes de los sensores 1 y 2</i>	
7.3.2.2.	<i>Propiedades catalíticas de los Pd-Exos ex vitro</i>	
7.3.2.3.	<i>Ensayos de biocompatibilidad y de internalización celular de los Pd-Exos</i>	
7.3.2.4.	<i>Síntesis de un profármaco del Panobinostat®</i>	
7.3.2.5.	<i>Actividad catalítica de los Pd-Exos^{A549}</i>	
7.3.2.6.	<i>Catálisis bioortogonal dirigida intracelular mediada por los Pd-Exos</i>	
7.3.3.	Conclusiones de esta sección	249
7.4.	PEG-HGNs-Exos como vectores de hipertermia óptica <i>in vitro</i>	249
7.4.1.	Experimental	252
7.4.1.1.	<i>Evaluación del potencial terapéutico in vitro de los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10}</i>	
7.4.1.2.	<i>Evaluación del potencial terapéutico in vitro de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs}</i>	
7.4.2.	Resultados y discusión	254
7.4.2.1.	<i>Evaluación del potencial terapéutico in vitro de los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10}</i>	
7.4.2.2.	<i>Evaluación del potencial terapéutico in vitro de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs}</i>	
7.4.3.	Conclusiones de esta sección	257

8. <u>EXOSOMAS DERIVADOS DE CÉLULAS MADRE</u>	
<u>COMO TRANSPORTADORES DE PARTÍCULAS</u>	
<u>TERAPÉUTICAS A TUMORES Y ZONAS MULTINODULARES</u>	263
8.1. Introducción	263
8.2. Experimental	267
8.2.1. Preparación de los PEG-HGNs-Exos ^{hpMSCs} fluorescentes	267
8.2.2. Generalidades de los modelos animales y los procedimientos	268
8.2.3. Estudio de la biodistribución de los PEG-HGNs-Exos ^{hpMSCs} <i>in vivo</i>	269
8.2.4. Evaluación de PEG-HGNs-Exos ^{hpMSCs} como vectores de hipertermia óptica <i>in vivo</i>	271
8.3. Resultados y discusión	275
8.3.1. Caracterización PEG-HGNs-Exos ^{hpMSCs} fluorescentes	275
8.3.2. Caracterización de los modelos tumorales	276
8.3.3. Biodistribución de los PEG-HGNs-Exos ^{hpMSCs} en el modelo de xenotrasplante	277
8.3.4. Biodistribución de los PEG-HGNs-Exos ^{hpMSCs} en un modelo tumoral multinodular	282
8.3.5. Hipertermia óptica mediada por los PEG-HGNs-Exos ^{hpMSCs} <i>in vivo</i>	287
8.4. Conclusiones	296
<u>9.A. CONCLUSIONES GENERALES</u>	303
<u>9.B. MAIN CONCLUSIONS</u>	307
<u>10. REFERENCIAS</u>	313
<u>11. ANEXOS</u>	

Glosario de abreviaturas

¹H-MRI	Imagen por resonancia magnética con 1-Hidrógeno
¹⁹F-MRI	Imagen por resonancia magnética con 19-Fluor
ADN	Acido desoxirribonucleico
AFM	Microscopía de fuerza atómica
ANOVA	Análisis de Varianza
APS	Persulfato de amonio
ARN	Acido ribonucleico
ASPE	Extracto de polisacárido sulfatado de algas
ATP	Adenosín -5-trifosfato
Au-Exos	Exosomas cargados con nanopartículas de oro
Au-Exos^{B16-F1}	Exosomas derivados de células B16-F1 cargados con nanopartículas de oro
Au-Exos^{B16-F10}	Exosomas derivados de células B16-F10 cargados con nanopartículas de oro
AuNPs	Nanopartículas de oro
BACE1	Enzima crítica beta secretasa 1
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina sérica
CCD	Detector de carga acoplada
CEA	Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal
CEICA	Comité de Ética de la Investigación de la Comunidad de Aragón
CIBA	Centro de Investigación Biomédica de Aragón
CNIC	Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares
CNTs	Nanotubos de carbono
CP	Cáncer de páncreas
CPMG	Carr Purcell Meiboom Gill
CrioTEM	Criomicroscopía electrónica de transmisión
CSIC	Centro Superior de Investigaciones Científicas
CT	Tomografía computarizada
CTC	Células tumorales circulantes
C-dots	Carbon dots
C-SAHA	Acido cumarina suberoilánida hidroxámico
DLS	Dispersión dinámica de la luz
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dubelcco
DMSO	Dimetilsulfóxido

DOX	Doxorrubicina
dsADN	Acido desoxirribonucleico de doble cadena
DTGS	Sulfato de triglicina deuterado
EC50	Concentración efectiva media
ECM	Matriz extracelular
EDC	N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EDS	Espectrometría de dispersión de energía de rayos X
EDX	Dispersión de energía de rayos X
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EMA	Agencia Europea del Medicamento
EPCAM	Molécula de adhesión epitelial celular
EPR	Permeación y retención aumentada
ESCRT	Complejo de clasificación endosomal necesario para el transporte
ETH	Escuela Politécnica Federal
EthD-1	Homodímero de etidio-1
ex/em	Excitación/emisión
Exos^{A549}	Exosomas derivados de células A549
Exos^{B16-F10}	Exosomas derivados de células B16-F1
Exos^{B16-F1}	Exosomas derivados de células B16-F10
Exos^{hpMSCs}	Exosomas derivados de células madre mesenquimales de placenta humana
Exos^{mMSCs}	Exosomas derivados de células madre mesenquimales de médula ósea de ratón
Exos^{U251-MG}	Exosomas derivados de células U251-MG
Exos^{U87-MG}	Exosomas derivados de células U87-MG
HDAC	Histona deacetilasa
HER2	Receptor-2 del factor de crecimiento epidérmico humano
FAP-GM-CDF	Fosfatasa ácida prostática-factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
FBS	Suero fetal bovino
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
Fe₃O₄NPs	Nanopartículas de óxido de hierro
Fe₃O₄-EDC-NHS-NPs	Nanopartículas de óxido de hierro conjugadas a EDC y NHS
Fe₃O₄-EDC-NHS-NPs:antiCD9	Nanopartículas de óxido de hierro conjugadas a EDC y NHS y funcionalizadas con el anticuerpo CD9

FGF-2	Factor de crecimiento de fibroblastos 2
FTIR	Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier
HAADF	Detector de electrones de alto ángulo en campo oscuro
HGNs	Nanopartículas de oro huecas
HIF	Factor inducible por hipoxia
hpMSCs	Células madre mesenquimales de placenta humana
HRP	Peroxidasa de rábano
HSP	Proteína de choque térmico
H&E	Hematoxilina y eosina
IACS	Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud
ICB	Instituto de Carboquímica
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
IgG	Inmunoglobulina G
ILVs	Vesículas intraluminales
INE	Instituto Nacional de Estadística
INMA	Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón
INSST	Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo
IP	Yoduro de propidio
ISCI	Instituto de Salud Carlos III
JSI-124	Curcubitacina I
LMA	Laboratorio de Microscopías Avanzadas
mARN	Acido ribonucleico mensajero
MHCII	Complejo mayor de histocompatibilidad II
miARN	Micro ácido ribonucleico
mMSCs	Células madre mesenquimales de médula ósea de ratón
MNPs	Nanopartículas magnéticas
MOFs	Estructuras cristalinas organometálicas
MP-AES	Espectroscopía de emisión atómica con plasma de microondas
MRI	Imagen por resonancia magnética
MSCs	Células madre mesenquimales
MSNPs	Nanopartículas mesoporosas de sílice
MVBs	Cuerpos multivesiculares
NHS	N-hidroxisuccinimida
NIR	Infrarrojo cercano
NIRF	Fluorescencia con infrarrojo cercano
NMR	Resonancia magnética nuclear
NPs	Nanopartículas

NPs:Ab	Nanopartículas:anticuerpos
NSs	Nanoláminas
NTA	Análisis de rastreo de nanopartículas
OMS	Organización mundial de la salud
PBAE	Poli-amino éster
PBS	Tampón fosfato salino
PBS-BSA	Tampón fosfato salino con albúmina sérica
PBS-BSA-saponina	Tampón fosfato salino con albúmina sérica y saponina
PCL	Policaprolactona
Pd-Exos	Exosomas cargados con nanoláminas de paladio
Pd-Exos^{A549}	Exosomas derivados de células A549 cargados con nanoláminas de paladio
Pd-Exos^{U251-MG}	Exosomas derivados de células U251-MG cargados con nanoláminas de paladio
PdNSs	Nanoláminas de Pd
PEEK	Poli éter éter cetona
PEG	Polietilenglicol
PEG-HGNs	Nanopartículas de oro huecas funcionalizadas con PEG
PEG-HGNs-Exos	Exosomas cargados con PEG-HGNs
PEG-HGNs-Exos^{B16-F10}	Exosomas derivados de células B16-F10 cargados con PEG-HGNs
PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs}	Exosomas derivados de hpMSCs cargados con PEG-HGNs
PEI	Polietilenimina
PET	Tomografía de emisión de positrones
<i>Perfecta</i>-Exos	Exosomas cargados con <i>Perfecta</i>
<i>Perfecta</i>-Exos^{mMSCs}	Exosomas derivados de mMSCs cargados con <i>Perfecta</i>
<i>Perfecta</i>-Exos^{B16-F10}	Exosomas derivados de células B16-F10 cargados con <i>Perfecta</i>
PFA	Paraformaldehído
PFC	Perfluorocarbono
PFPE	Perfluoropoliéter
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PLGA	Ácido poli lactic-co-glicólico
PLLA	Andamios de ácido poli(L-láctico) tratados con plasma
POEGMA	Poli(oligo (etilenglicol) metil éter metacrilato
PTA	Ácido fosfotúngstico
Pt-Exos	Exosomas cargados con nanopartículas de platino
Pt-Exos^{hpMSCs}	Exosomas derivados de hpMSCs cargados con nanopartículas de platino

Pt-Exos^{B16-F10}	Exosomas derivados de células B16-F10 cargados con nanopartículas de platino
PtNPs	Nanopartículas de platino
PTX	Paclitaxel
PVP	Poli (vinipirrolidona)
p:p	Peso:peso
p/v	Peso/volumen
QDs	Quantum dots
QNM	Medidas nanomecánicas cuantitativas
RAB	Proteína asociada a Ras
rARN	Acido ribonucleico ribosomal
RD	Real Decreto
RIPA	Ensayo de radioimmunoprecipitación
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RVG	Glicoproteína viral de la rabia
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con SDS
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
siARN	Acido ribonucleico de silenciamiento
SNARES	Proteínas solubles de unión al factor sensible a la N-etilmaleimida
SNR	Relación señal a ruido
SPIONs	Nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas
SPR	Resonancia del plasmón superficial
SPECT	Tomografía computarizada por emisión de fotón simple
STEM	Microscopía electrónica de transmisión de barrido
TBE	Tampón tris borato EDTA
TBS	Tampón tris salino
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TGA	Análisis termogravimétrico
TPP	Polifenol del té
USPIOs	Nanopartículas de óxido de hierro ultrapequeñas superparamagnéticas
UV-VIS	Ultravioleta visible
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VLA-EC	Valor límite ambiental de exposición de corta duración

v:v	Volumen:volumen
XPS	Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X
WB	Western blot

Resumen

El trabajo presentado en esta memoria, titulado “VEHÍCULOS HÍBRIDOS FORMADOS POR EXOSOMAS Y NANOPARTÍCULAS. APLICACIONES EN TERAPIA Y DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER” se ha desarrollado en el grupo de investigación *Partículas y Películas Nanoestructuradas (NFP)*, perteneciente al Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA) de la Universidad de Zaragoza. Este trabajo se ha llevado a cabo con una beca predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (FPU) dentro del Programa Estatal de Promoción del Talento y su Empleabilidad (referencia FPU15/03419) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte del Gobierno de España. Además, se enmarca dentro del proyecto CADENCE financiado como *Advanced Grant* por el European Research Council (ref. 742684).

La mayor parte de la investigación se ha realizado en los laboratorios de este grupo, situados en el INMA, en el Laboratorio de Microscopías Avanzadas (LMA) asociado al mismo, así como en los laboratorios del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), durante un periodo de 4 años (2016-2020). Una parte significativa de los ensayos experimentales relacionados con el uso de exosomas y *Perfecta* para imagen y diagnóstico se llevaron a cabo en la Universidad Politécnica de Milán, durante una estancia de investigación de un mes y medio realizada en el grupo *SupraBioNano Lab*, dirigido por el Prof. Pierangelo Metrangolo. Durante esta Tesis Doctoral también se realizó otra estancia de investigación de tres meses en la Escuela Politécnica Federal (ETH) de Zúrich en el grupo de investigación liderado por el Prof. Andrew deMello. Otros colaboradores muy importantes de esta tesis han sido el grupo del Prof. Asier Unciti-Broceta de la Universidad de Edimburgo, implicados en el desarrollo de los catalizadores bioortogonales como terapia anticancerosa; así como el Dr. Vicente Cebolla, del Instituto de Carboquímica (ICB) del Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

El cáncer es un problema global que necesita seguir siendo estudiado en profundidad. En este trabajo se ha realizado una aproximación multidisciplinar combinando avances logrados en el campo de la nanomedicina, con las terapias avanzadas en el área de los exosomas, con el objetivo de intentar profundizar en el desarrollo de estrategias selectivas para el tratamiento y el diagnóstico del cáncer. Con este propósito, se han sintetizado, funcionalizado y caracterizado diversos nanomateriales y se ha optimizado su encapsulación en el interior de exosomas

procedentes de diversas líneas celulares, antes de ser usados como vectores teragnósticos tanto *in vitro* como *in vivo*.

El presente documento se estructura en diferentes capítulos para facilitar su comprensión y lectura. El **capítulo 1 (introducción)** contiene una breve exposición de la situación actual, resaltando la necesidad que existe de desarrollar agentes terapéuticos y diagnósticos selectivos para el tratamiento del cáncer. Se describe cómo las terapias avanzadas, y en particular la nanotecnología, proporcionan herramientas útiles y novedosas que, combinadas con las propiedades de los exosomas, se postulan como estrategias alternativas y prometedoras en aplicaciones oncológicas. Sin embargo, todavía no se han desarrollado abordajes efectivos para encapsular y combinar los productos nanotecnológicos con las vesículas extracelulares; y tampoco se conocen en profundidad las interacciones de estos productos con células y tejidos del organismo. Así mismo, la entrega de dichos materiales de forma específica y selectiva al tejido diana es un problema que todavía está por resolver.

Considerando los antecedentes expuestos, el **capítulo 2 (objetivos del trabajo)** describe el objetivo principal, así como los objetivos específicos de esta Tesis Doctoral. Los capítulos posteriores recogen los estudios realizados para solventar las principales limitaciones existentes hasta la fecha y mostrar el posible uso de estos vectores híbridos para el teragnóstico del cáncer.

Para facilitar la lectura de esta memoria, los materiales y métodos generales empleados a lo largo de la Tesis Doctoral para caracterizar los nanomateriales, así como para purificar y caracterizar los exosomas, tanto por métodos fisicoquímicos como por métodos biológicos se recogen en un solo capítulo. Igualmente, este capítulo contiene tanto la metodología empleada para trabajar con los cultivos celulares, como los procedimientos utilizados para estudiar la biocompatibilidad y la internalización y localización intracelular de los diferentes complejos estudiados (**capítulo 3, materiales y métodos**). Tanto los exosomas como los nanomateriales sintetizados se han caracterizado por técnicas fisicoquímicas (espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), análisis termogravimétrico (TGA), espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), análisis de rastreo de nanopartículas (NTA), microscopía electrónica de transmisión (TEM), espectrofotometría ultravioleta visible (UV-VIS), dispersión dinámica de la luz (DLS), espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), potencial zeta y microscopía de fuerza atómica (AFM)) y por técnicas bioquímicas (*western blot* (WB), microscopía óptica y electroforesis). Además, la caracterización biológica y la interacción de los complejos de partículas y exosomas se ha estudiado evaluando su citotoxicidad metabólica, su afectación al ciclo

celular, así como su muerte por necrosis/apoptosis mediante citometría de flujo. Las técnicas de espectrometría de emisión atómica por plasma de microonda (MP-AES), microscopía confocal e inmunocitoquímica se emplearon para determinar la internalización y la localización de las partículas y los exosomas en los diversos compartimentos celulares. Independientemente de los contenidos de este capítulo general, en cada una de las secciones de la Tesis Doctoral se particularizan los métodos generales, o bien, se recogen técnicas específicas usadas en el correspondiente capítulo.

El **capítulo 4** incluye las **estrategias empleadas para encapsular los nanomateriales** (nanopartículas de oro huecas (HGNs), HGNs funcionalizadas con polietilenglicol (PEG-HGNs) y *Perfecta*) **en el interior de los exosomas**. En concreto, se han investigado abordajes de encapsulación forzada por métodos fisicoquímicos exógenos y métodos de carga indirecta por captación natural por parte de las células parentales. A partir de los resultados obtenidos y como alternativa a las estrategias exploradas en el capítulo anterior, en el **capítulo 5** se detalla un **método novedoso desarrollado por primera vez en esta Tesis Doctoral, para sintetizar in situ los diferentes nanomateriales** (nanopartículas de oro (AuNPs), nanoláminas de Pd (PdNSs) y nanopartículas de Pt (PtNPs)) en el interior de los exosomas. Esto permite el ensamblaje de diferentes nanoestructuras metálicas directamente en el interior de dichas vesículas sin dañar su integridad ni comprometer sus funciones.

Una vez estudiadas las metodologías de encapsulación en los exosomas, en los capítulos posteriores se evaluó la capacidad de los vectores híbridos como herramientas para el tratamiento y el diagnóstico del cáncer. El **capítulo 6** recoge **los diversos métodos diagnósticos**, incluyendo el desarrollo de un microdispositivo de captura y captación magnética de exosomas presentes en sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma de páncreas, conjugando nanopartículas magnéticas de óxido de hierro ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$) a un anticuerpo específico exosomal. Además, se estudió el posible uso de los exosomas cargados con *Perfecta* (*Perfecta-Exos*) como agentes de imagen por resonancia magnética (MRI) *in vivo*. Finalmente, también se presentan estudios preliminares para utilizar los exosomas cargados con las AuNPs como agente de contraste por tomografía computarizada (CT).

Los abordajes para el posible **tratamiento del cáncer con los exosomas combinados con los nanomateriales** mostrados en los primeros capítulos, se recogen en el **capítulo 7**. En concreto, este capítulo incluye los experimentos relacionados con 1) el uso de exosomas cargados con PtNPs (Pt-Exos) como agentes citotóxicos selectivos de células diana; 2) exosomas con un tropismo celular específico cargados

con PdNSs (Pd-Exos) para el tratamiento de células cancerosas por catálisis bioortogonal, mediante reacciones de desalquilación activadas por Pd *in vitro*; y 3) exosomas como vectores selectivos de hipertermia óptica cargados con PEG-HGNs (PEG-HGNs-Exos) *in vitro* en monocultivos y en co-cultivos.

En el **capítulo 8** se ha llevado a cabo el ***tratamiento in vivo de tumores*** en un modelo de xenotrasplante y de regiones malignas en un modelo multinodular en ratones atímicos ***por hipertermia óptica mediada por los exosomas*** cargados con las PEG-HGNs.

Finalmente, se presentan las ***conclusiones generales*** (**capítulo 9**), donde se destacan las principales aportaciones. El listado de referencias se recoge en el apartado de **Bibliografía**, y en los **Anexos**, se incluyen las publicaciones (artículos científicos y contribuciones a congresos) resultado de esta Tesis Doctoral, así como algunas de las metodologías empleadas para su desarrollo.

La **figura 1** recoge un resumen del trabajo contenido en esta memoria.

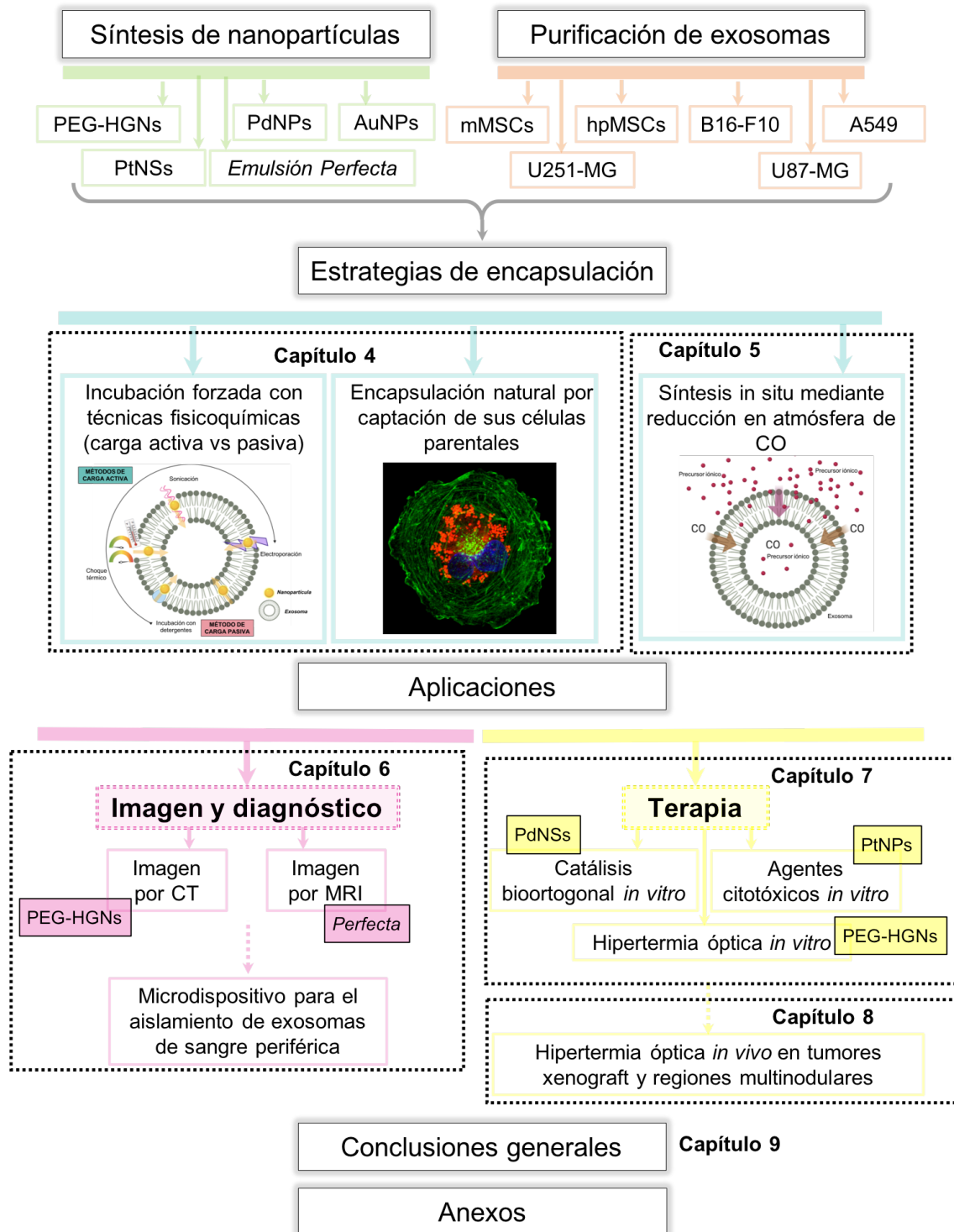


Figura 1. Estructura de la memoria de esta Tesis Doctoral

Summary

The present doctoral Thesis dissertation entitled: “HYBRID VECTORS INVOLVING EXOSOMES AND NANOPARTICLES.APPLICATION TO CANCER DIAGNOSIS AND THERAPY” has been developed in the group of Nanostructured Films and Particles IN the Institute of Nanoscience and Materials of Aragon (INMA) from the University of Zaragoza. The work has been funded by the predoctoral FPU (*Formación de Profesorado Univesitario*) fellowship (ref FPU15/03419) from the Ministry of Education, Culture and Sports of the Spanish Government. The work was carried out within project CADENCE, and Advanced Grant found by the European Research Council (ref. 742684).

Most of the experimental research has been carried out in a period of 4 years (from 2016 to 2020) in the facilities of this group located in the INMA and in the Advanced Microscopy Laboratory (LMA), as well as in the laboratories localized in Biomedical Research Center of Aragon (CIBA). Furthermore, some of the experimental studies related with the use exosomes and *Perfecta* for imaging and diagnosis were performed at the Polytechnic University of Milan, during a research stay of month and a half in the SupraBioNanoLab Lab research group, headed by Prof. Pierangelo Metrangolo. During this PhD Thesis, another three months research stay was also carried out at the *Eidgenössische Technische Hochschule* (ETH) Zürich in the research group led by Prof. Andrew deMello. Other key collaborations in this Thesis were developed with Prof. Asier Unciti-Broceta at the University of Edinburg (bioorthogonal catalysis) and with Prof. Vicente Cebolla at the Instituto de Carboquímica (ICB) CSIC.

Cancer is a multifaceted global health issue that continues to demand new solutions. This PhD Thesis aims to develop a multidisciplinary approach based on the latest advances in the field of nanomedicine and in the area of the extracellular vesicles such as exosomes. For this purpose, different nanomaterials have been synthesized, functionalized and characterized, then encapsulated within exosomes derived from various cell lines. This work enabled us to investigate the development of selective strategies for the treatment and diagnosis of cancer, both *in vitro* and *in vivo*.

This dissertation is structured in different chapters for the sake of an easier understanding. **Chapter 1 (introduction)** presents general concepts about cancer, nanotechnology and exosomes, paying particular attention in the importance and the need to develop new selective therapeutic and diagnostic tools for cancer. It discusses how advanced therapies, and in particular nanotechnology, provide useful and suitable

tools, that, when combined with the properties of exosomes, become promising alternative strategies for oncological applications. However, to the date there are no effective methodologies to encapsulate and combine the nanomaterials with extracellular vesicles, and thus. Also, interaction of these products with cells and tissues in the organism is not well known.

Chapter 2 (*objectives of the work*) addresses the main and the subsidiary objectives of this PhD Thesis. The following chapters are focused on the studies developed to achieve the objectives and to solve the problems related to the use of these exosome-nanoparticle hybrids as cancer theragnostic vehicles. To make easier the reading of this work, **chapter 3 (*materials and methods*)** describes the methodology generally employed throughout the study to purify and characterize exosomes and nanoparticles. This chapter also includes the procedures for cell culture maintenance, evaluation of cytotoxicity and studies of internalization of the nanoparticles. Exosomes and nanoparticles have been characterized by a widely battery of physicochemical (X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), thermogravimetric analysis (TGA), nanoparticle tracking analysis (NTA), transmission electron microscopy (TEM), ultraviolet visible spectrophotometry (UV-VIS), dynamic light dispersion (DLS), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), zeta potential and atomic force microscopy (AFM)) and biological (western blot (WB), optic microscopy and electrophoresis) techniques also included in chapter III. In addition, the biological interactions of the exosome complexes with the target cells were studied by monitoring their metabolic cytotoxicity and their effects in the cell cycle as well as in cell death by necrosis or apoptosis. Finally, techniques such as microwave plasma atomic emission spectroscopy (MP-AES), confocal microscopy and immunocytochemistry were used to study the trafficking of the particles and the exosomes in different cells.

Chapter 4 is focused ***on methods for the encapsulation of the nanoparticles*** (Hollow gold nanoparticles (HGNs), HGNs functionalized with polyethyleneglycol (PEG-HGNs) y *Perfecta*) ***within exosomes***. Different exogenous methods (electroporation, passive loading by diffusion, thermal shock, sonication and saponin-assisted loading) were studied, as well as the internalization using the natural exosome biogenesis pathway following the incubation with their parental cells. The physicochemical and biological characterization of the resulted exosomes is thoroughly described.

Chapter 5 details a ***chemical methodology developed in this work to enable the controlled assembly*** of Pd, Au and Pt ***nanostructures*** (AuNPs, PdNSs and PtNPs) directly within exosomes employing CO as a gaseous reducing agent. This is performed under wet conditions without disrupting their integrity and functionality.

After studying the encapsulation of each nanomaterial their application in cancer treatment and diagnosis was explored. In **Chapter 6** the ***diagnostic properties of exosomes were explored***. The first section of this chapter is dedicated to the design of a microdevice for the isolation of exosome from whole blood of pancreatic cancer patients as cancer biomarkers. Then, the imaging properties of exosomes loaded with *Perfecta* as *in vitro* and *in vivo* contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI) were assessed. Furthermore, preliminary studies were carried out to elucidate the potential use of Au-NPs loaded exosomes as CT contrast agents.

Cancer treatment by exosome-nanoparticle hybrids is studied in **chapter 7**. Specifically, this chapter includes the experiments related to: 1) the use of Pt-Exos as selective cytotoxic antitumoral agents; 2) the characteristics of Pd-Exos as biorthogonal catalyst to mediate Pt-triggered dealkylation reactions *in vitro* and inside cancerous cells, and 3) the demonstration of the specific *in vitro* optical hyperthermia therapy using exosome-mediated delivery of Near Infrared (NIR) responding plasmonic nanoparticles.

Finally, in **chapter 8** the ***in vivo biodistribution*** of exosomes loaded with PEG-HGNs was explored in a xenograft model and in a multinodular intraperitoneal model. Then, the ***treatment*** of primary subcutaneous solid tumors and the multinodular areas in the peritoneum (that simulate a neoplasm in an advanced metastatic stage), were explored.

Next is **chapter 9**, where we summarized the ***main conclusions*** of this work. The **references** list, the publications resulting from this work (scientific articles and conference proceedings) as well as **Annexes** describing specific experimental procedures are given in the final section of this Thesis.

Figure 1 summarizes the PhD Thesis structure herein presented.

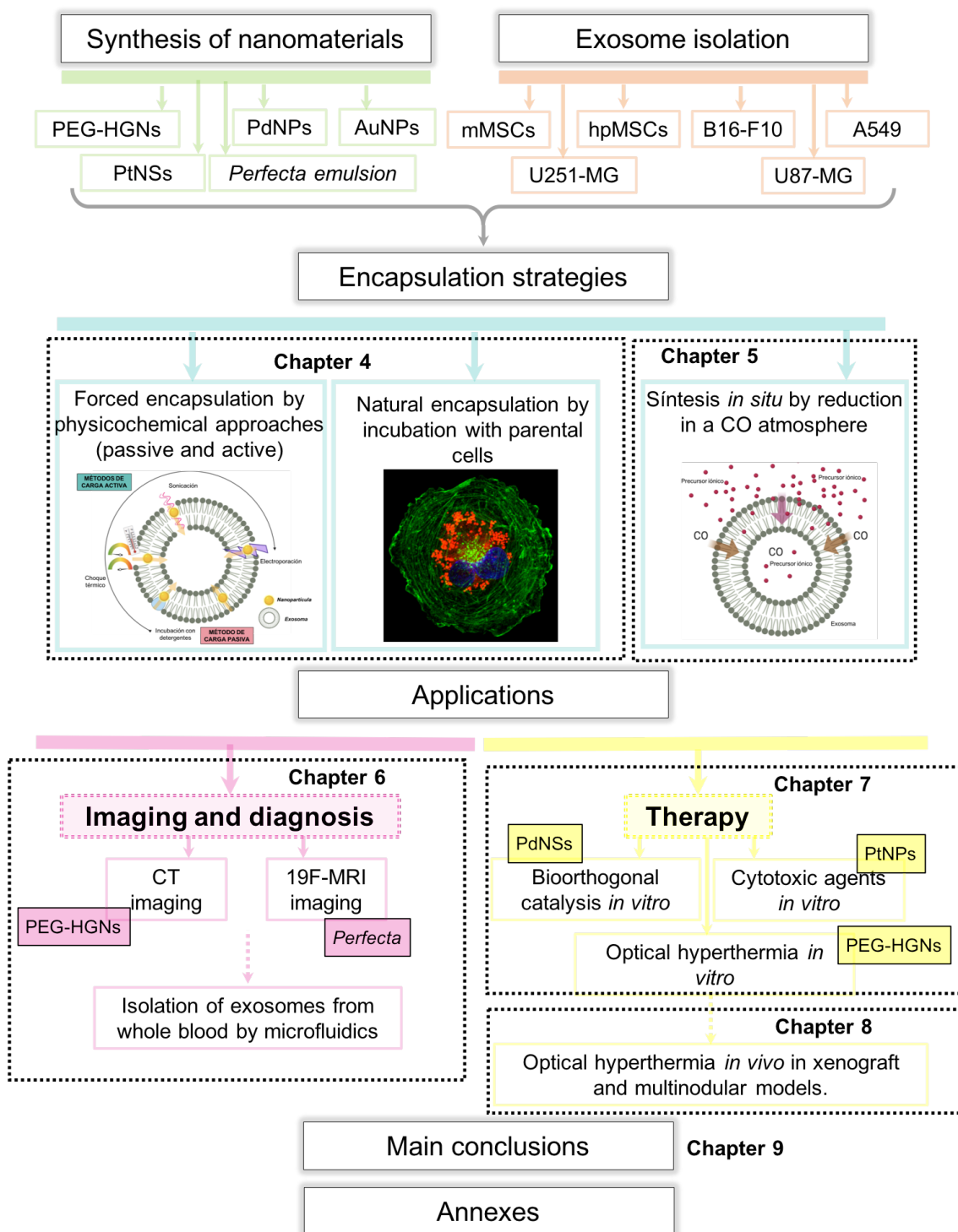


Figure 1. Structure of this PhD dissertation: encapsulation of the nanomaterials in exosomes from different cell lines for their evaluation as therapeutics and diagnostics tools, both *in vitro* and *in vivo*.

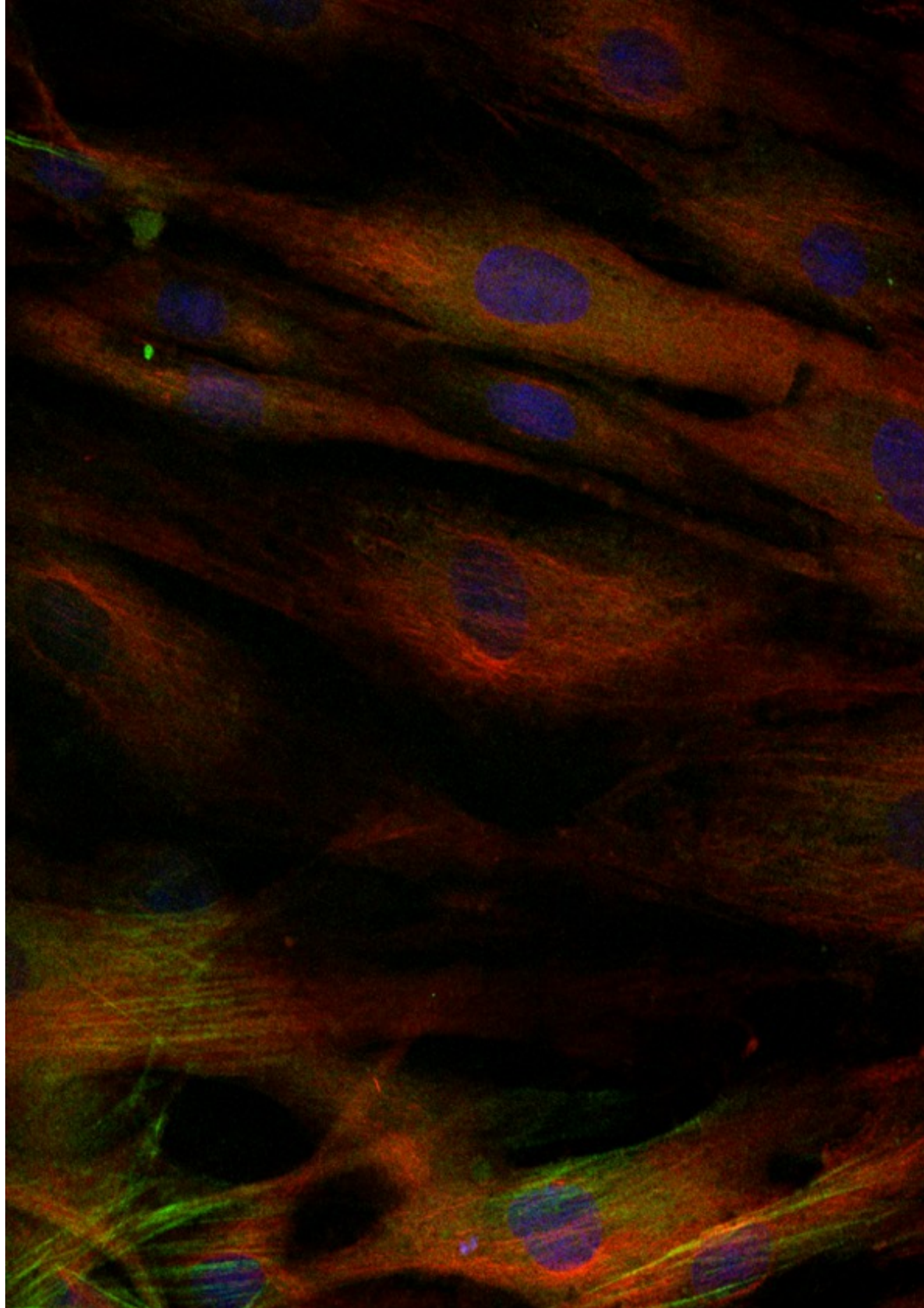


Imagen de microscopía confocal de fibroblastos humanos.
Marcaje de actina (verde), tubulina (rojo) y núcleos (azul).

1. Introducción

1. Introducción

1.1. El cáncer

1.1.1. El cáncer en cifras

Hoy en día, el cáncer sigue constituyendo una de las principales causas de morbilidad y de mortalidad a nivel mundial, con aproximadamente 18,1 millones de casos nuevos diagnosticados en 2018. Además, según la *International Agency for Research on Cancer*, se estima que a lo largo de las próximas décadas el número de casos nuevos a nivel mundial aumentará hasta alcanzar los 29,5 millones de casos en 2040 (un aumento del 63,1 %).^{1,2}

A nivel mundial, los tumores más frecuentemente diagnosticados en 2018 fueron los de pulmón (11,6 %), mama (11,6 %), colon y recto (10,2 %), próstata (7,1 %) y estómago (5,7 %). A nivel nacional, el cáncer también es una de las principales causas de morbi-mortalidad y el número absoluto de tumores diagnosticados ha continuado aumentando desde hace décadas. De hecho, según los últimos datos proporcionados por el Instituto Nacional de Estadística (INE) referentes al año 2018, los tumores constituyen la segunda causa de muerte en España (26,4 % de los fallecimientos), por detrás de las enfermedades del sistema circulatorio.³ Se estima que en este año 2020, el número de nuevos casos de cáncer diagnosticados en España alcanzará los 277.394. Los cánceres detectados con más frecuencia serán colon y recto, próstata, mama, pulmón y vejiga.⁴ Este aumento en la incidencia del cáncer en las últimas décadas se ha relacionado directamente con varios factores tales como el envejecimiento de la población (la edad un factor de riesgo crucial en el desarrollo del cáncer y de hecho, el 75 % de personas diagnosticadas con esta enfermedad son mayores de 65 años) y la exposición a factores de riesgo como tabaco, alcohol, contaminación u obesidad.⁵

1.1.2. Conceptos básicos sobre el cáncer

Con el objetivo de mantener el orden y el equilibrio a medida que los tejidos crecen y se renuevan, las células individuales deben adaptar su comportamiento a las necesidades del organismo como unidad. Para ello, las células se dividen de forma controlada y organizada cuando se necesitan células nuevas para reemplazar a aquellas que están inactivas o no funcionales. El cáncer se considera un desorden por el cual un conjunto de células se divide anormalmente, lo que conduce a la formación de agregados celulares conocidos como tumor, que se nutren del organismo completo y pueden dañar tejidos vecinos, alterando su homeostasia y fisiología. Si además estas

1. Introducción

células adquieren la capacidad de migrar e invadir tejidos lejanos con su crecimiento descontrolado, este tumor primario evolucionará a una metástasis. Esta división y multiplicación celular descontroladas se deben a alteraciones genéticas y epigenéticas que sufren las células malignas causadas por 1) estímulos externos, tales como la radiación ionizante, compuestos químicos o infecciones virales; y en menor medida 2) mutaciones originadas al azar y factores hereditarios.

El proceso por el cual una célula sana se transforma en cancerosa es conocido como carcinogénesis, y se relaciona con alteraciones del material genético, es decir, en mutaciones patológicas en la información que porta el ácido desoxirribonucleico (ADN). Estas mutaciones dotan a la célula sana con la capacidad de dividirse con más velocidad, generando células hijas que conservan dicha mutación. A su vez, esas células hijas (clones de la célula parental), son capaces de generar nuevos subclones con otras mutaciones que les confieren mayor capacidad de proliferación y crecimiento, lo que, con el paso del tiempo, genera clones neoplásicos capaces de evitar ser reconocidos por el propio sistema inmune del organismo, dando lugar a una masa tumoral o neoplasia. Las principales alteraciones genéticas implicadas en el desarrollo de cáncer son, en primer lugar, la sobreexpresión de los denominados oncogenes (relacionados con el crecimiento descontrolado y proliferación celular); y, por otro lado, la inhibición de los genes supresores de tumores (los cuales controlan la proliferación, reparación y apoptosis o muerte celular). Los oncogenes y los genes supresores de tumores son de varios tipos. Entre ellos, pueden destacarse los que codifican para factores de crecimiento, receptores o componentes de las vías de señalización intracelulares activadas por factores de crecimiento como las proteínas Ras. Otros codifican proteínas reparadoras del ADN (mediadores de la respuesta al daño del ADN como la proteína p53), o reguladores del ciclo celular o del programa de muerte celular.

Para que las mutaciones de los genes responsables de la carcinogénesis logren persistir y transferirse de una célula a otra, un tumor y su microambiente tumoral tienen que cumplir con dos características fundamentales: 1) desarrollar una inestabilidad genómica que favorezca la adquisición de las mutaciones, y 2) presentar procesos de inflamación tumorigénica y angiogénesis para dotar al tumor de un soporte y matriz sobre el que crecer, mediado por macrófagos y mastocitos que se infiltran en el tumor y producen factores para promover el crecimiento tumoral, facilitando a su vez la invasión tisular y la extravasación celular, favoreciendo el desarrollo de las metástasis.

El cáncer es una enfermedad compleja, no sólo existen más de 200 tipos de cáncer, sino que los tumores son tejidos altamente heterogéneos a nivel genético no sólo entre pacientes, sino también entre las propias células que lo componen y entre las

1. Introducción

diferentes regiones y áreas metastásicas en las que pueden derivar. Todo ello hace que cada tumor posea unas características particulares, que en algunos casos son completamente diferentes al resto de otros cánceres, pudiendo considerarse incluso enfermedades independientes, con sus causas, su evolución y su tratamiento específico. En general, el tumor está formado por las células cancerosas propiamente dichas (parénquima) y por el microambiente que las rodea que es fundamentalmente tejido conjuntivo de sostén vascularizado, conocido como estroma. Dentro del estroma, se encuentran vasos sanguíneos y matriz extracelular (ECM), que proporcionan un soporte para el crecimiento tumoral, así como una gran variedad de tipos celulares entre los que destacan las células endoteliales, los pericitos, los fibroblastos, los adipocitos, las células mesenquimales asociadas a carcinoma, células inflamatorias y células del sistema inmune como macrófagos y monocitos asociados a tumores. Todos estos componentes del estroma constituyen una compleja red de comunicación intercelular basada en la liberación de citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, moléculas inflamatorias o vesículas extracelulares (p.ej. exosomas) que influyen sobre la remodelación de la ECM, así como de la vascularización del tumor y por tanto de sus niveles de crecimiento, diseminación y acondicionamiento de nuevos nichos en tejidos distales para la generación de metástasis. Por otro lado, el parénquima tumoral está formado por las células tumorales propiamente dichas.

1.2. La nanotecnología y la nanomedicina

El término nanotecnología (que deriva de la palabra griega “*nanno o nâno*” que significa enano) fue acuñado por Norio Taniguchi en 1974 refiriéndose al procesamiento, separación y manipulación de los materiales átomo por átomo.⁶ Sin embargo, el origen conceptual de la nanotecnología suele situarse en la famosa charla de Richard Feynman “*There is plenty of room at the bottom*”, en 1959. Se trata de una disciplina emergente (más significativamente desde finales del siglo XX) que está contribuyendo al avance de diferentes ciencias gracias a la manipulación, desarrollo y utilización de materiales y estructuras con un orden de magnitud en la escala nanométrica.⁷ La Comisión Europea define los nanomateriales como estructuras compuestas por al menos un 50 % de partículas con tamaños entre 1 y 100 nm en alguna de sus dimensiones (**figura 1.1**).⁸ Debido a la alta relación superficie/volumen y, en consecuencia, al elevado número de átomos expuestos en la superficie de estos nanomateriales (comparado con el número total de átomos del material), y también gracias a sus dimensiones intrínsecas, estas nanoestructuras exhiben propiedades únicas, a menudo muy diferentes a las que presentan sus análogos macroscópicos. Se ha demostrado que pequeños cambios en la forma y en el tamaño de los nanomateriales

1. Introducción

conlleven una modificación significativa en sus propiedades, y por ello, funciones muy concretas están directamente correlacionadas con las características morfológicas, de composición y de tamaño de las nanoestructuras.

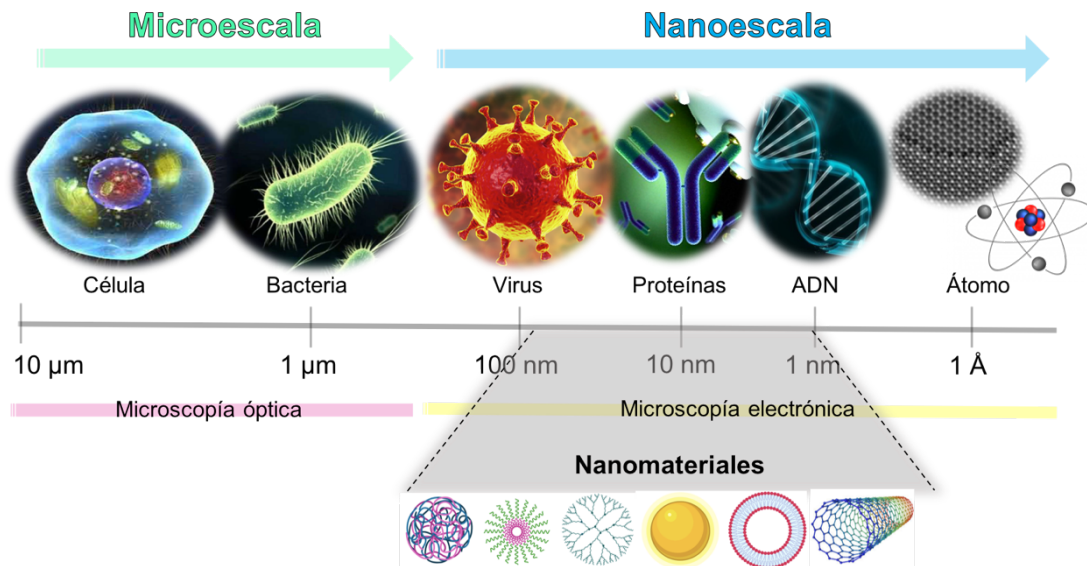


Figura 1.1. Ilustración de la microescala y la nanoescala, incluyendo en esta última algunos ejemplos de nanomateriales (1-100 nm).

Hoy en día, la nanotecnología posee múltiples aplicaciones en campos tan diversos como la electrónica, la informática, el medio ambiente, la cosmética, las telecomunicaciones, la biología y la medicina.⁹ Entre las aplicaciones multidisciplinarias de la nanotecnología, las que se registran en el campo de la medicina y la biología han despertado un enorme interés. Esta estrecha relación entre la nanotecnología y la medicina, ha dado lugar a la aparición de una nueva disciplina: la nanomedicina.^{10,11}

La nanomedicina se define como la aplicación de la nanotecnología en el ámbito biomédico, dotando a la medicina convencional de nuevas herramientas para la reparación de tejidos, el diagnóstico y el tratamiento de patologías, a menudo mediante la vehiculización de fármacos a tejidos y áreas de interés.^{12,13} Se trata de una ciencia de reciente aplicación, que recoge el guante lanzado hacia 1900 por Paul Ehrlich cuando enunció el concepto de “bala mágica” (un agente terapéutico capaz de destruir determinados patógenos sin causar daños a células sanas).¹⁴ A lo largo del siglo XX, se lograron grandes avances en el conocimiento de los procesos de comunicación celular y biología molecular, que junto con el desarrollo de una amplia gama de microscopios de sonda local con resolución nanométrica, permitieron comprender la estructura de los nanomateriales, mejorar los procesos de síntesis y desarrollar aplicaciones en múltiples campos incluido el biomédico.¹⁵

1. Introducción

Puesto que las dimensiones de los componentes celulares son de escala nanométrica, el tamaño de los nanomateriales les confiere propiedades útiles como la capacidad de atravesar barreras fisiológicas e interactuar a diferentes niveles con biomoléculas presentes en células, tejidos y órganos diana. Además, su elevada área superficial hace que sean químicamente más reactivos y los hace susceptibles de ser conjugados con una gran variedad de ligandos (incluidos anticuerpos, polímeros, copolímeros, aptámeros, etc.), generando dispositivos y materiales más específicos y multifuncionales que detecten, diagnostiquen y/o combatan una cierta patología. Todo ello otorga a la nanomedicina un gran potencial en el desarrollo de nuevos dispositivos, materiales, fármacos o moléculas con aplicaciones tanto en diagnóstico temprano como en el tratamiento de una amplia variedad de patologías con alta especificidad.

1.2.1. Aplicaciones de la nanomedicina

Existe una gran variedad de nanomateriales muy diferentes entre sí con aplicaciones médicas. Una de las clasificaciones más ampliamente utilizada distingue entre nanomateriales orgánicos o inorgánicos.¹⁶ Entre los primeros, destacan las micelas lipídicas, los liposomas, las nanopartículas (NPs) poliméricas y copoliméricas (p.ej. NPs de ácido poli lactic-co-glicólico (PLGA)), los carbon dots (C-dots) y los nanotubos de carbono (CNTs). Por su parte, algunas de las nanoestructuras inorgánicas más ampliamente utilizadas en el campo de la nanomedicina son las nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNPs), las nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas (SPIONs), los quantum dots (QDs), o las nanopartículas de oro (AuNPs), entre otras.

Como se ha descrito anteriormente, las características de morfología, composición y tamaño específicas de cada nanomaterial están directamente correlacionadas con sus propiedades y, por tanto, determinan sus funciones y aplicaciones. Dentro del ámbito de la medicina, estas propiedades inherentes y características de los nanomateriales permiten su aplicación en tres áreas principales (**figura 1.2**): 1) diagnóstico (diseñar sistemas de imagen y de detección de patologías en fases tempranas), 2) terapia y liberación controlada de fármacos (para dirigir plataformas nanotecnológicas que contengan moléculas u otros agentes terapéuticos y que sean capaces de transportar y activar dichos agentes exclusivamente a las áreas de interés) y, 3) ingeniería de tejidos y medicina regenerativa (cuyo principal objetivo es reparar o reemplazar tejidos y órganos dañados utilizando nanomateriales con diversas propiedades: antiinflamatorias, regenerativas, antibacterianas etc.).

1. Introducción

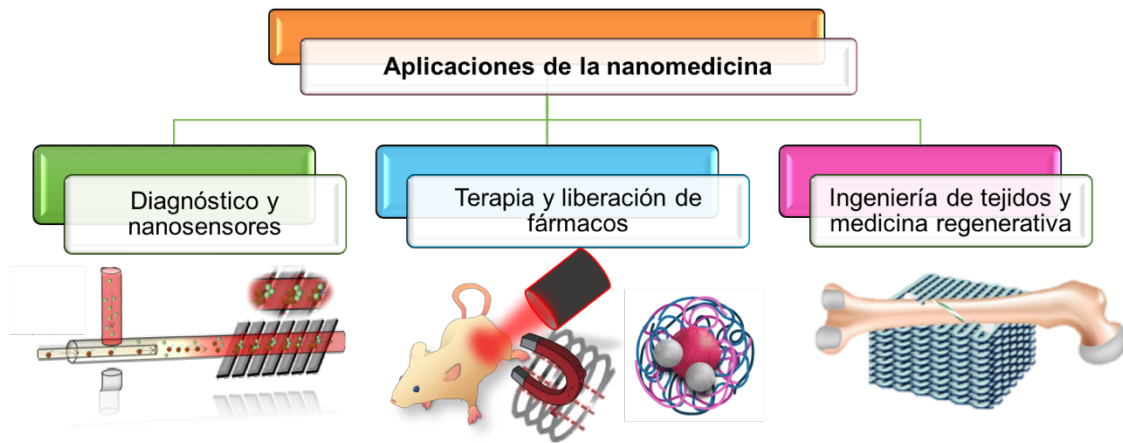


Figura 1.2. Aplicaciones principales de la nanomedicina: 1) Imagen, diagnóstico y sensores; 2) terapia y liberación de fármacos; y 3) ingeniería de tejidos y medicina regenerativa.

El empleo de nanomateriales para el diagnóstico de enfermedades, permite una mejora en la detección y diagnóstico precoz, así como en la monitorización de la respuesta ante una determinada terapia. Así, Cabrera-García y *col.s.*, desarrollaron NPs de sílice de 90 nm conteniendo centros magnéticos de hierro y de gadolinio en su interior que aumentaban significativamente el contraste positivo y negativo de las imágenes MRI *in vivo* comparado con agentes de contraste comerciales.¹⁷ También se han diseñado nanomateriales formados por C-dots y SPIONs para ser visualizadas simultáneamente por varias técnicas de diagnóstico, dando lugar a sistemas duales capaces de ser monitorizados por CT, MRI o por luminiscencia (p.ej. NPs de óxido de gadolinio dopadas con iterbio y erbio).^{18,19} Por su parte, Liu y *col.s.*, sintetizaron NPs de óxido de gadolinio dopadas con lantánidos fluorescentes, susceptibles de ser visualizadas de manera dual por MRI y por luminiscencia *in vivo*.²⁰

Por otro lado, la nanomedicina también ha dado lugar al desarrollo de biosensores o microdispositivos de alto rendimiento para extraer muestras biológicas y analizar la presencia de determinados antígenos en fluidos corporales, con el objetivo de detectar simultáneamente varios marcadores biológicos de ciertas patologías, así como alteraciones moleculares para mejorar la precisión y la sensibilidad en el diagnóstico. Estos biosensores a menudo presentan ventajas importantes comparados con los métodos de diagnóstico convencionales: pequeño tamaño y portabilidad, mayor sensibilidad, fácil manejo por personal no especializado y necesidad de poca cantidad de muestra, siendo por tanto menos invasivo para el paciente.^{21,22}

También se ha propuesto el uso de los nanomateriales como vectores terapéuticos y de liberación de fármacos para numerosas enfermedades. Para ello, se han desarrollado y sintetizado NPs que actúan como vehículos de fármacos y materiales

1. Introducción

bioactivos con propiedades antimicrobianas y regenerativas, siendo componentes principales de implantes. Recientemente, García-Salinas *y cols.*, sintetizaron fibras de policaprolactona (PCL) de 300 nm de diámetro con la técnica del electrohilado y las cargaron con diversos aceites esenciales, incluido el timol. Un estudio *in vivo* demostró que estas nanofibras inhibían el crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus* en heridas de ratones atímicos, promoviendo su cicatrización y su regeneración.²³ Otra ventaja de la nanomedicina es el uso de los nanomateriales como agentes antitumorales para combatir el cáncer haciendo llegar estas moléculas terapéuticas de manera localizada y controlada a sus tejidos diana. Esto permitiría evitar efectos secundarios y toxicidades asociados a los mismos. Men *y cols.*, encapsularon doxorrubicina (DOX) en una partícula multicapa híbrida (liposoma-polimérica) compuesta de lípidos, ácido hialurónico y poli-amino éster (PBAE). Este polímero (sensible al pH) permitió la liberación del fármaco de manera controlada modificando el pH. Estudios *in vivo* demostraron como estas partículas liberaban DOX en las áreas tumorales de manera regulada, minimizando los efectos secundarios en comparación con DOX libre.²⁴ Otras veces, en lugar de transportar un fármaco, la propia nanopartícula se convierte en un agente terapéutico. Un ejemplo muy conocido es el de los SPIONs o el de las HGNs que actúan como vectores de hipertermia, calentándose en respuesta a un campo externo y destruyendo las células objetivo gracias al aumento de la temperatura producido.

Otro de los campos más explorados, es el empleo de productos nanotecnológicos en la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa. La nanotecnología permite desarrollar soportes biodegradables y porosos, sobre los cuales pueden depositarse células progenitoras y moléculas de señalización celular, creando un microambiente propicio para crear tejidos vascularizados *in vivo*. Por ejemplo, Holmes *y cols.*, han desarrollado andamios de ácido poli(L-láctico) tratados con plasma (PLLA) recubiertos con CNTs que presentaban propiedades mecánicas similares a las del tejido cartilaginoso, promoviendo significativamente la diferenciación de células madre a condrocitos, y por tanto, la regeneración de tejido.²⁵

1.3. Tratamientos convencionales del cáncer vs terapias avanzadas

Actualmente, las principales estrategias empleadas en el ámbito clínico para combatir el cáncer son la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia. La cirugía suele ser más eficaz en el caso de tumores que estén localizados, aunque también se emplea para eliminar neoplasias que no son tratables y aliviar los síntomas del paciente. Por su parte, la quimioterapia y la radioterapia emplean moléculas citotóxicas o radiaciones de alta energía, respectivamente, para mediar la muerte de las células cancerosas

1. Introducción

dañando su ADN e impidiendo su división descontrolada. Sin embargo, estas técnicas también afectan a los tejidos sanos y, en numerosas ocasiones, su eficacia contra el tumor está limitada, por lo que han de ser combinadas con la cirugía. Aunque estos fármacos antineoplásicos se administran en dosis habitualmente bajas, la escasa especificidad del tratamiento propicia la aparición de efectos sistémicos (a nivel digestivo, nervioso o muscular, entre otros), lo que repercute en la calidad de vida del paciente, y con frecuencia obliga a disminuir la cantidad de fármacos administrados, lo que, a su vez disminuye la eficacia del tratamiento, dando lugar a la aparición de resistencias y/o recidivas. Factores como la gran heterogeneidad genética de las células cancerosas, el propio microambiente tumoral (el cual presenta numerosas proteínas de adhesión y citoquinas que lo convierten en una barrera física para la entrada de los fármacos), así como el pH y las condiciones de hipoxia que se dan en este entorno tumoral, están relacionados con la aparición de resistencias a los fármacos convencionales. Para obtener un efecto sinérgico y por tanto mejores resultados en el tratamiento del cáncer, en numerosas ocasiones se emplean tratamientos convencionales combinados entre sí.

Ante este panorama, se ha realizado un gran esfuerzo para desarrollar estrategias terapéuticas alternativas, y en los últimos años están emergiendo nuevos abordajes como la inmunoterapia, la terapia hormonal o las terapias avanzadas (medicamentos basados en genes, células y tejidos). La inmunoterapia emplea anticuerpos monoclonales, vacunas o células T para estimular el sistema inmune del organismo con el objetivo de reforzar su acción para combatir el tumor. Por su parte, la terapia hormonal pretende bloquear o proporcionar determinadas hormonas para inhibir el crecimiento de ciertos tumores sensibles a las mismas. Las terapias avanzadas engloban una variedad de productos médicos basados en genes, células y tejidos, que ofrecen oportunidades innovadoras para el tratamiento de patologías con opciones terapéuticas limitadas. En 2017, un trabajo bibliográfico (a partir de las bases de datos Clinicaltrials.gov, International *Clinical Trials Registry Platform* de la Organización Mundial de la Salud (OMS), y EudraCT) estimó que en los últimos 15 años, se habían realizado 939 ensayos clínicos en todo el mundo usando medicamentos de terapias avanzadas.²⁶ Un ejemplo de terapia avanzada implantada en la clínica es el Provenge®, un medicamento aprobado en 2013 que utiliza células mononucleares autólogas para el tratamiento del cáncer de próstata metastásico resistente a hormonoterapia.

1.3.1. La nanomedicina aplicada al tratamiento del cáncer

En las últimas décadas, gran parte de los esfuerzos de la nanomedicina se centran en la aplicación clínica de sus productos y materiales para el diagnóstico y el tratamiento oncológico. En este ámbito, la nanomedicina representa una gran

1. Introducción

oportunidad para mejorar las estrategias terapéuticas convencionales o para diseñar nuevos tratamientos más eficaces que reduzcan los efectos secundarios, eviten la generación de resistencias y mejoren la eficacia terapéutica.

Algunas de las aplicaciones de la nanomedicina incluyen el tratamiento de tumores sólidos por hipertermia (tanto magnética como óptica). La hipertermia se emplea en el ámbito clínico desde la década de los 80 y se fundamenta en un aumento local de la temperatura en la zona del organismo que contiene la neoplasia.²⁷ Cuando ciertas partículas se excitan de forma externa con un láser (hipertermia óptica) o con un campo magnético (hipertermia magnética), provocan una elevación local de la temperatura de los tejidos o áreas donde están acumuladas. Este aumento de temperatura desencadena la muerte térmica de las células tumorales cuando ésta aumenta más de 40 °C - 43 °C.

La aplicación de las nanopartículas magnéticas (MNPs) para tratamientos oncológicos ya se ha trasladado al ámbito clínico. Actualmente se aborda el tratamiento de cáncer de próstata y de glioblastoma mediante la tecnología Nanotherm™, basado en la generación de calor en los tumores tras la administración intratumoral de NPs de óxido de hierro (con un recubrimiento de aminosilano), seguido de la aplicación de un campo magnético alterno externo que provoca una disipación de energía térmica mediante relajaciones de Neél (por rotación del espín) y de Brown (por rotación de la partícula).

Por su parte, las AuNPs como agente de hipertermia óptica para terapias antitumorales también han sido objeto de gran interés en los últimos años.²⁸ Xiao y cols., diseñaron un nanomaterial híbrido compuesto de ADN, polietilenglicol (PEG) y bastones de oro, que contenían DOX en su interior. Estas nanoestructuras son susceptibles de ser irradiadas con un láser con una longitud de onda en el infrarrojo cercano (NIR), causando la muerte de células tumorales *in vitro* e inhibiendo el crecimiento de tumores sólidos *in vivo* a través de un aumento de la temperatura y de la liberación del agente quimioterapéutico encapsulado en su interior.²⁹ Hale y cols., funcionalizaron AuNPs de 2 nm de diámetro con un análogo del fármaco trastuzumab emtansina, aumentando la tolerabilidad y el efecto terapéutico del fármaco en animales con tumores de células de un carcinoma hepatocelular.³⁰ Actualmente, existen terapias como AuroShell® y AuroLaser® (NPs de silicio recubiertas con una fina capa externa de oro) que están en fase clínica para el tratamiento de tumores refractarios y/o recurrentes de cabeza y cuello. Aunque el uso de estas partículas está ganando importancia en el tratamiento de varios tipos de cáncer,³¹ el transporte y la vehiculización de las mismas exclusivamente a las zonas diana es todavía un reto por resolver.

1. Introducción

La nanomedicina también ha permitido diseñar nuevos dispositivos de diagnóstico, así como nuevos agentes de imagen mucho más específicos permitiéndonos obtener una detección precoz en estadios más tempranos del cáncer, así como la monitorización y visualización de los tejidos y áreas tumorales de manera más específica.^{32,33}

En los últimos años ha aparecido un nuevo concepto conocido como teragnosis (**figura 1.3**), cuyo objetivo es el desarrollo y el diseño de estrategias personalizadas que permitan no sólo detectar de forma temprana diversas afecciones, sino simultáneamente tratarlas.

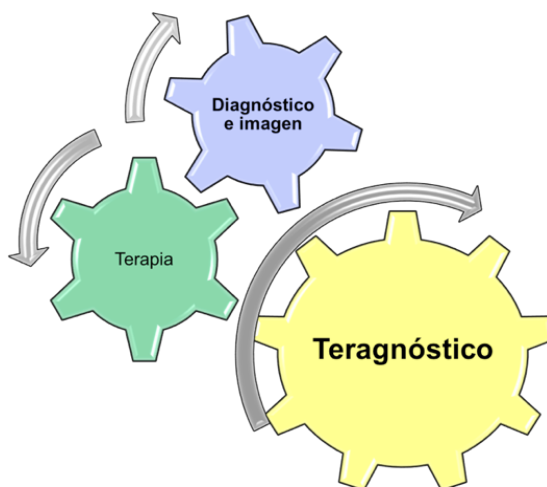


Figura 1.3. Combinación de nanomateriales con propiedades de terapia e imagen para dar lugar a una nueva aplicación multidisciplinar de la nanomedicina: teragnóstico.

Esta nueva aproximación, permitiría tener un *feedback* casi instantáneo de la eficacia de una determinada terapia, así como un control muy estricto en la respuesta de cada paciente a la misma, aumentando la eficacia en el tratamiento. Por ejemplo, Wang y *col.s.*, han desarrollado MNPs de grafeno funcionalizadas con quitosano, susceptibles de ser visualizadas por MRI en las áreas tumorales gracias a las SPIONs y, por otra parte, capaces de liberar DOX encapsulada en su interior, acumulándose exitosamente en tumores de ratones tras 24 y 48 horas de su administración intravenosa.³⁴ En otro trabajo, Shen y *col.s.*, desarrollaron NPs multifuncionales conjugadas a un anticuerpo anti-HER2 para la detección y el diagnóstico de cáncer de mama con una alta especificidad.³⁵

Ya existen nanomateriales implantados para el tratamiento oncológico en la clínica, así como en fases avanzadas de ensayos clínicos. Las formulaciones liposomales (tanto recubiertas con PEG como desnudas) fueron los primeros nanomateriales aprobados para su uso en humanos. Destacan los derivados de la DOX

1. Introducción

para el tratamiento de cáncer de ovario, de mama o el sarcoma de Kaposi (p.ej. Doxil®, Myocet® y DaunoXome®). También existen NPs para el tratamiento de cáncer de mama ya aprobadas o en fase avanzada de ensayos clínicos, como el Abraxane® (paclitaxel (PTX) encapsulado en NPs de albúmina), o para el tratamiento de hepatocarcinomas como el NBTXR3® (cristales de óxido de hafnio). Finalmente, cabe destacar las formulaciones a base de conjugados poliméricos con proteínas o con fármacos. Por ejemplo, el Oncaspar® que se emplea para el tratamiento de leucemias, consiste en la unión covalente del enzima L-asparaginasa a una cadena de PEG. Por su parte, el Opaxtio® fue el primer conjugado polímero-fármaco en alcanzar la fase III de un ensayo clínico para el tratamiento de cáncer de mama y de ovario. Se trata de una combinación de ácido poliglutámico y PTX.

Este campo está en continuo y rápido crecimiento, desde 2016 a 2019 se han registrado 15 ensayos clínicos³⁶ y se han aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) dos nuevos tipos de NPs administradas intravenosamente e intratumoralmente como alternativa para combatir el cáncer:

- VYXEOS: formulación liposómica biolaminar que contiene citarabina y daunorubicina para el tratamiento de leucemia mieloide aguda con dos quimioterapias de manera sinérgica (aprobada en 2018).³⁷
- NBTXR3/Hensify: NPs de 50 nm de óxido de hafnio recubiertas con grupos fosfato empleadas para el tratamiento de sarcoma en tejidos blandos localmente avanzado (aprobada en 2019).³⁸

La principal aportación de la nanomedicina en el ámbito oncológico se centra en el diseño de vectores nanométricos para 1) proporcionar a los fármacos y moléculas ya existentes modificándolos para un direccionamiento activo, utilizando ligandos específicos como péptidos, anticuerpos o ácidos nucleicos expuestos en la superficie de los vectores, que reconocen específicamente epítomos tumorales, maximizando la eficacia de entrega; 2) generar sistemas multifuncionales que lleven en su interior varios fármacos o incluso que tengan propiedades terapéuticas y al mismo tiempo sirvan como vectores de imagen para generar plataformas teragnósticas; y 3) dirigir NPs a varias dianas de manera simultánea para abordar el tratamiento del tumor a través de diferentes rutas metabólicas celulares o actuar ante diferentes mutaciones. La **figura 1.4** ilustra la multitud de posibilidades que existen para crear un nanomaterial multifuncional y teragnóstico.

Cuando un nanomaterial se administra intravenosamente, debe de superar una primera barrera que consiste en la adsorción de proteínas plasmáticas en la superficie,

1. Introducción

lo que favorece su reconocimiento por parte del sistema fagocítico mononuclear (SFM) y por tanto su eliminación del sistema circulatorio, acumulándose en tejidos como hígado y bazo, favoreciendo su eliminación y aclaramiento renal. En caso de superar las barreras extracelulares y alcanzar el tejido tumoral, las NPs deben de acumularse e interactuar con las células tumorales para liberar su contenido y realizar su función antitumoral.

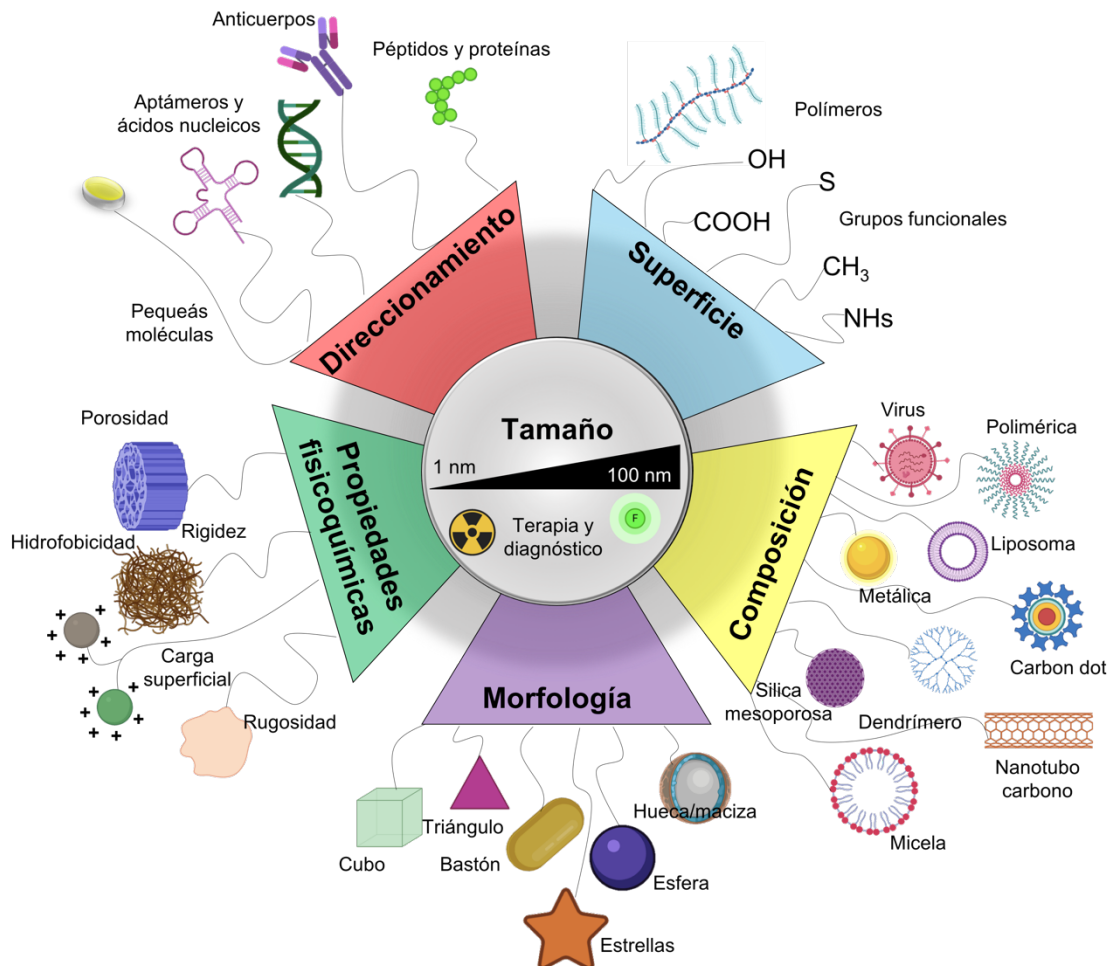


Figura 1.4. Esquema representativo de una nanopartícula multifuncional. Algunas posibilidades para cambiar su morfología, composición, propiedades fisicoquímicas, así como las moléculas expuestas en su superficie y su especificidad hacia moléculas y dianas terapéuticas. (Adaptado de Dios y cols.; y Heinz y cols.).^{39,40}

La eficacia terapéutica de estos materiales y por tanto su acumulación en los tumores, fue ya evidenciada hace más de 30 años, atribuida principalmente al fenómeno de permeación y retención aumentada (EPR).⁴¹ En las primeras fases de los tumores, se induce la rápida formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) para favorecer su nutrición y por tanto su crecimiento. Esta vasculatura tumoral se caracteriza por un endotelio poco cohesionado, con la presencia de amplios espacios, poros y fenestras entre las células endoteliales que los rodean. La alta permeabilidad vascular,

1. Introducción

así como la escasez de drenaje linfático, favorece que las nanoestructuras con un tamaño entre 100 y 200 nm se extravasen al tejido tumoral y queden retenidas en él, pudiendo llevar a cabo su efecto terapéutico antitumoral. Este mecanismo de acumulación pasiva de NPs en los tejidos tumorales es conocido como efecto EPR. El tamaño, la carga y la forma de los nanomateriales, son cruciales en la extravasación y la acumulación de los mismos en los tumores, ya que determinan directamente parámetros clave (el grado de reconocimiento por parte de los macrófagos del SFM, su tiempo de circulación en sangre, su difusividad a través de la pared de los vasos sanguíneos y sus interacciones con las propias células tumorales y la matriz tumoral).^{42,43} Por ejemplo, se ha demostrado que macromoléculas pequeñas de entre 3,3 y 10 kDa (radio hidrodinámico entre 2 y 3 nm) difundían y se acumulaban mucho más rápido en regiones internas de un tumor xenograft en ratones, comparado con moléculas más grandes de entre 70 y 2000 kDa (radio hidrodinámico entre 7 y 25 nm).⁴⁴ La acumulación preferencial de AuNPs menores de 50 nm se ha confirmado en varios trabajos.⁴⁵ Se ha visto una acumulación diferencial de las AuNPs en tumores de adenocarcinoma de páncreas en función de su tamaño (NPs de 30, 50 y 70 nm se acumulaban exitosamente, mientras que aquellas con un diámetro mayor de 100 nm no se encontraron en los tumores).⁴⁶ En cuanto a la carga superficial de las partículas, también se ha descrito como, las NPs cargadas positivamente son más fácilmente reconocidas por el MPS siendo eliminadas más rápidamente.⁴⁷

Sin embargo, en la mayor parte de las ocasiones este mecanismo pasivo no logra acumular una cantidad de NPs suficientemente alta como para llevar a cabo una acción terapéutica exitosa en la diana tumoral (se ha visto que menos del 0,7 % de las partículas se acumulan en los tumores por este fenómeno). Es por ello que se han diseñado otras estrategias para dirigir de forma activa las NPs a los tumores, basándose en la funcionalización de las mismas con pequeñas moléculas, anticuerpos, aptámeros, polisacáridos o polímeros que reconocen y se unen más específicamente a la membrana de las células diana.

Una biomolécula ampliamente utilizada es el ácido hialurónico, que es capaz de unirse a receptores presentes en la superficie de las células. El ácido hialurónico es un polisacárido que supone el principal componente de la ECM, junto con el colágeno. Este polisacárido se une específicamente a CD44, frecuentemente sobreexpresado en la superficie de células madre tumorales.⁴⁸

Otro elemento a menudo empleado son los aptámeros, se trata de ácidos nucleicos (tanto ácido ribonucleico (ARN) como ADN) de cadena corta compuestos por varios nucleótidos. Se caracterizan por ser pequeños, muy sensibles, biodegradables y

1. Introducción

capaces de reconocer dianas selectivas.⁴⁹ Algunos de los aptámeros más ampliamente empleados son AS-1411 y la molécula de adhesión epitelial celular (EpCAM), los cuales se conjugan específicamente a los receptores de la nucleolina y de la proteína EpCAM, respectivamente (ambos presentes en la membrana de las células tumorales). Así, Due y cols., se sirvieron del aptámero AS-1411, que reconoce específicamente la nucleolina para dirigir partículas mesoporosas de sílice cargadas con CX-5461 (inhibidor de la síntesis de un ácido ribonucleico ribosomal (rARN) que promueve la muerte de las células tumorales por autofagia) al núcleo de células HeLa de tumores xenograft en ratones.⁵⁰ La principal desventaja en el empleo de aptámeros es, además de su posible degradación por parte de las nucleasas, el alto coste de producción.⁵¹

El uso de péptidos también tiene numerosas ventajas ya que su producción tiene un bajo coste y son estables y sencillos de conjugar a la superficie de las NPs con alta densidad debido a su pequeño tamaño.⁵² Por ejemplo, el péptido 1 de unión a interleuquina 4 (sobrexpresada en células de cáncer de pulmón y en células tumorales endoteliales) se ha conjugado a liposomas cargados con DOX, que se acumulaban más eficazmente en los tumores comparado con liposomas sin el péptido.⁵³ Otro de los péptidos más empleados para funcionalizar NPs es el péptido RGD, el cual es capaz de unirse específicamente a las integrinas α_v presentes en la superficie de las células endoteliales tumorales.^{54,55} El uso de péptidos para funcionalizar NPs presenta inconvenientes como susceptibilidad de ser reconocidos y digeridos por las proteasas celulares.⁵¹

Las proteínas (y especialmente los anticuerpos) son las biomoléculas más ampliamente utilizadas para dirigir selectivamente NPs a dianas tumorales, gracias a su alta especificidad en el reconocimiento de antígenos presentes en la membrana de las células cancerosas. Algunos de los anticuerpos utilizados para alcanzar las células tumorales son: anti-CD20, anti-CD67, anti-EGFR y anti-Fas. Por ejemplo, se utilizó un anticuerpo CD47 para funcionalizar NPs de óxido de hierro cargadas con gemcitabina, incrementándose su internalización en células humanas de adenocarcinoma ductal de páncreas (Panc215 y PAc345).⁵⁶ Sin embargo, dado el gran tamaño de los anticuerpos, la cantidad de los mismos que se puede acoplar a cada nanopartícula es limitada.

En este trabajo se han utilizado NPs de diversos metales nobles, como AuNPs con propiedades ópticas adecuadas, capaces de absorber luz en una determinada longitud de onda, transformándola en energía térmica para mediar la muerte de células tumorales a través de la fototerapia. También se ha trabajado con nanoláminas de paladio (PdNSs) capaces de catalizar reacciones intracelularmente para combatir y mediar la apoptosis de células cancerosas. Otro de los nanomateriales empleados han

1. Introducción

sido nanopartículas de platino (PtNPs) con propiedades citotóxicas antitumorales. Por otro lado, se han sintetizado MNPs como vectores para aislamiento de vesículas exosomales, posteriormente utilizadas como elementos diagnósticos del cáncer.

1.4. Los exosomas

1.4.1. Definición, composición, biogénesis y funciones

La práctica totalidad de las células presentes en el organismo son capaces de secretar distintos tipos de vesículas extracelulares. Entre ellas se encuentran los cuerpos apoptóticos, los ectosomas, las microvesículas y los exosomas. La **tabla 1.1** muestra las propiedades y características de los diferentes tipos de vesículas extracelulares.

Tabla 1.1. Comparación de las características de diferentes vesículas extracelulares: exosomas, microvesículas, ectosomas y cuerpos apoptóticos. (Adaptado de Burger y cols., y Chen y cols.)^{57,58}

	Exosomas	Microvesículas	Ectosomas	Cuerpos apoptóticos
Tamaño	20-150 nm	150-1000 nm	50-200 nm	50-500 nm
Densidad gradiente sacarosa	1,13-1,19 g/mL	No determinado	No determinado	1,16-1,28 g/mL
Morfología al microscopio electrónico	Esféricos, ligeramente alargados o con forma de copa	Forma irregular y heterogénea	Estructura redondeada	Heterogénea
Sedimentación	100000 g	10000 g	160000-200000 g	1200-100000 g
Composición lipídica	Colesterol, esfingomielina, ceramida, fosfatidilcolina, fosfatidilserina y el fosfatidilinositol	Exponen fosfatidilcolina	Colesterol, diacilglicerol y exponen fosfatidilcolina	No determinado
Composición proteica	Tetraspaninas (CD63, CD9, CD81, etc.) Alix y TSG101	Integrinas, selectinas y CD40	CR1 y enzimas proteolíticas. No expresan CD63	Histonas
Origen intracelular	Cuerpos multivesiculares	Membrana plasmática	Membrana plasmática	Muerte celular por apoptosis

Lo exosomas fueron descubiertos por Trams y cols. en 1981, quienes los describieron como vesículas de origen celular procedentes de la exfoliación de la membrana plasmática.⁵⁹ Dos años después, se publicó la producción intracelular de vesículas por reticulocitos maduros de oveja. Estas vesículas estaban englobadas en compartimentos endosomales de gran tamaño, conteniendo receptores de transferrina

1. Introducción

procedentes de la membrana plasmática celular (mayoritariamente localizados en la superficie interna de las vesículas). Finalmente, observaron que estos compartimentos endosomales multivesiculares se fusionaban con la membrana plasmática liberando su contenido al espacio extracelular. Se concluyó que estas vesículas eran capturadas desde la membrana plasmática y secretadas al exterior, denominándose desde entonces “exosomas”.⁶⁰

Desde 1994, la cantidad de artículos publicados cada año conteniendo la palabra “exosoma” ha ido aumentando exponencialmente, demostrando el gran interés de la comunidad científica por este área de investigación (**figura 1.5**).^{61,62}

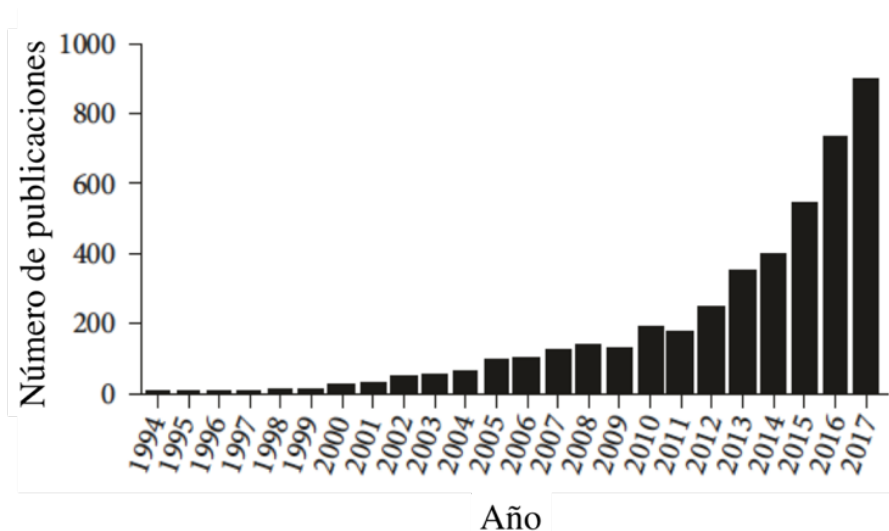


Figura 1.5. Número de publicaciones anuales recogidas en los últimos 23 años relacionadas con trabajos de investigación conteniendo exosomas. (Adaptado de Wang y cols.).⁶¹

Los exosomas se definen como vesículas extracelulares esféricas de origen endocítico con un diámetro entre 20 y 150 nm, rodeados de una membrana fosfolipídica orientada y organizada de forma similar a la membrana plasmática. Además de fosfolípidos, la membrana exosomal está enriquecida en ciertos esfingolípidos (esfingomielina y ceramidas) y glicerofosfolípidos como por ejemplo la fosfatidilcolina, fosfatidilserina y el fosfatidilinositol. En su interior transportan gran variedad de moléculas bioactivas (péptidos, lípidos, proteínas y material genético como ácido ribonucleico mensajero (mARN) o micro ácido ribonucleico (miARN)).⁶³ También se ha descrito la presencia de ADN de doble (dsADN) y simple cadena acoplado a la membrana del exosoma, así como ADN mitocondrial.⁶⁴

En general, la composición de los exosomas depende directamente de la célula de la que provienen, si bien, existen biomoléculas conservadas constitutivamente de forma general en todos los exosomas.⁶⁵ En lo que se refiere a su composición proteica, en la superficie de los mismos se pueden encontrar proteínas asociadas a su origen

1. Introducción

endosomal como por ejemplo proteínas de transporte y de fusión (anexinas, flotilinas, ATPasas) de adhesión (tetraspaninas como CD9, CD63, CD81 o LAMP1), así como proteínas involucradas en la biogénesis de los cuerpos multivesiculares (MVBs) como Alix y TSG101. También se han descrito proteínas de choque térmico (HSP) como por ejemplo HSP70 y HSP90, proteínas presentadores de antígeno y proteínas del citoesqueleto de la célula.^{66,67,68} Sin embargo, por el momento no se ha descrito la existencia de proteínas presentes únicamente en exosomas que no se encuentren en la célula de la que derivan. La mayoría de las proteínas mencionadas anteriormente sólo se han encontrado en la superficie de los exosomas, lo que permite diferenciarlos de otras vesículas extracelulares de diferente naturaleza. Por ello, aunque no se conoce la composición completa de los exosomas, la presencia de determinadas proteínas como CD9, CD63 o TSG101 se utiliza como identificador de los mismos.^{67,68}

La formación de los exosomas se inicia con la invaginación de la membrana plasmática, dando lugar a un endosoma temprano, que va madurando a un endosoma tardío y fusionándose con otros endosomas a la vez que se producen invaginaciones de sus membranas, formando MVBs.^{69,70} La formación de los MVBs está dirigida por el complejo de clasificación endosomal necesario para el transporte (ESCRT), donde se encuentran las proteínas Alix y TSG101. Cuando se produce la invaginación de la membrana de estos MVBs, se generan las denominadas vesículas endosómicas intraluminales (ILVs). Una vez formados estos MVBs, se transportan intracelularmente a la periferia celular regulados por la familia de proteínas asociadas a Ras (RAB), como por ejemplo Rab25 y Rab27a y Rab27b.⁶⁶ Finalmente, los MVBs se fusionan con la membrana plasmática y liberan todo su contenido vesicular al exterior, es decir, los exosomas.^{71,72} Las proteínas solubles de unión al factor sensible a la N-etilmaleimida (SNAREs) son las encargadas de dirigir la etapa final de fusión de los MVBs con la membrana plasmática. Igualmente, complejos proteicos presentes en la envoltura de las vesículas, así como la familia de proteínas Sec1 son necesarios para la secreción de estas vesículas extracelulares.^{73,74}

La **figura 1.6** ilustra el proceso de biogénesis de los exosomas así como la composición y estructura de los mismos.

1. Introducción

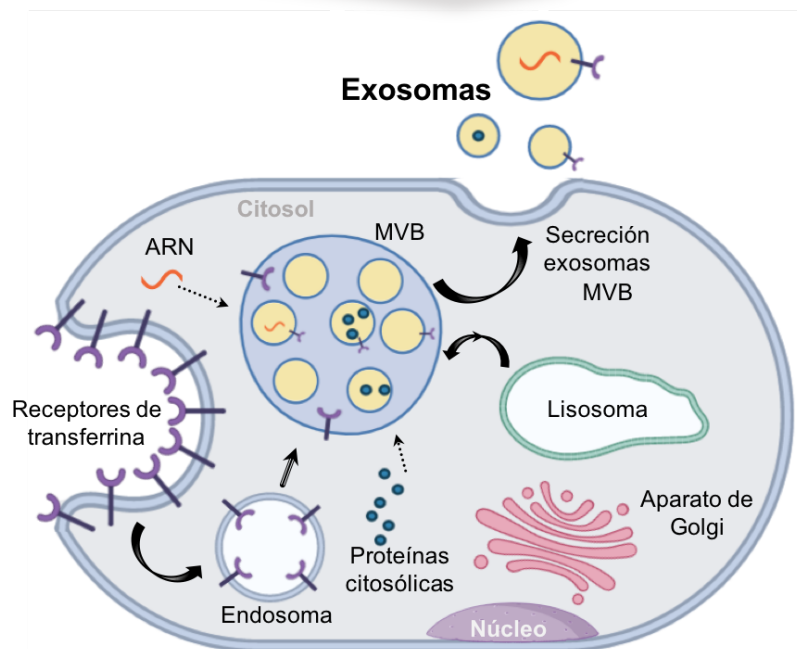
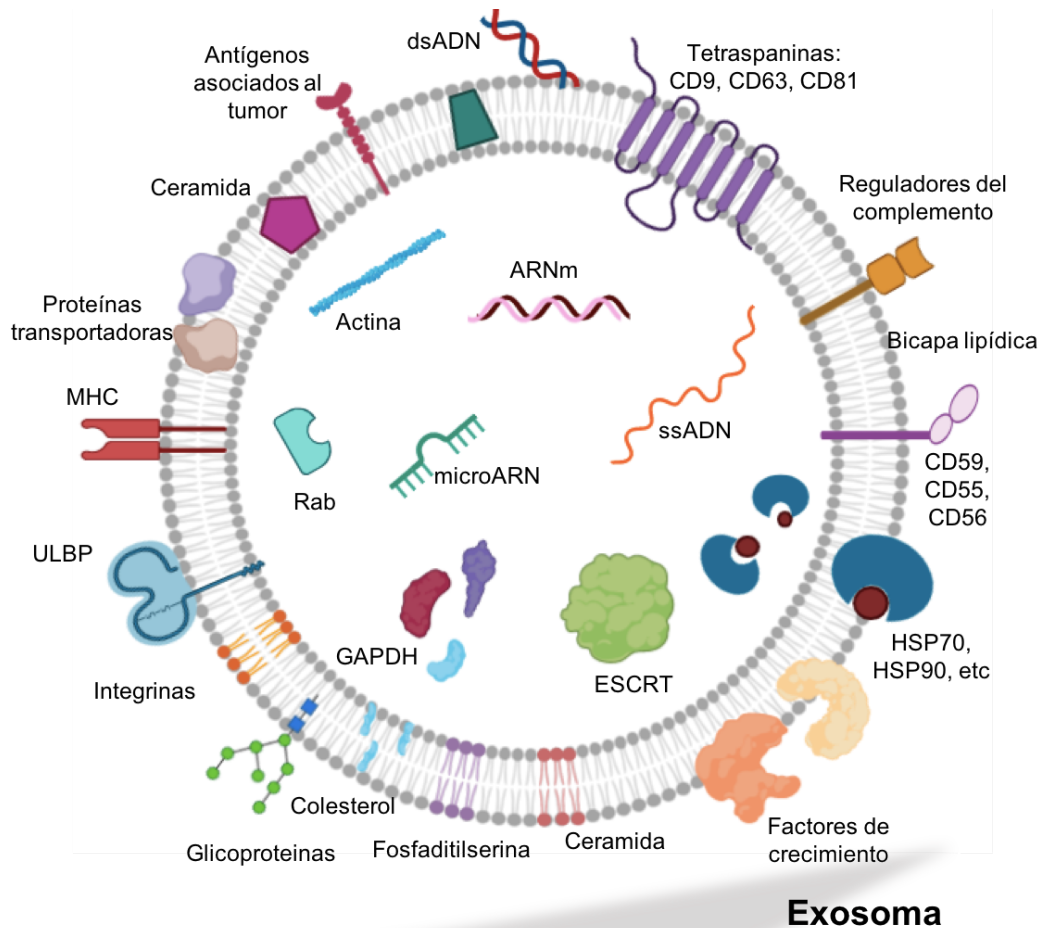


Figura 1.6. En la parte superior se ilustra la estructura y la composición del exosoma. En la parte inferior se muestra su ruta de biogénesis. Se forman dentro de los MVBs generados a partir de la maduración de un endosoma. Estos MVBs sufren un proceso de maduración produciéndose en su interior las vesículas intraluminales, las cuales se fusionarán con la membrana plasmática para liberarse al exterior de la célula en forma de exosomas. (Adaptado de Zhou y cols., y Ni y cols.,)^{75,76}

1. Introducción

Una vez que los exosomas son liberados por la célula donante, viajan por el torrente sanguíneo hasta alcanzar la célula receptora. El destino final de los exosomas está determinado principalmente por moléculas de superficie (tetraspaninas, integrinas, proteoglicanos y lectinas).⁷⁷ Sin embargo el proceso por el cual estas vesículas son internalizadas por parte de las células diana todavía no se conoce con exactitud. Se han propuesto diferentes posibles mecanismos: 1) señalización mediante receptores solubles y juxtacrinos (mediante este mecanismo los receptores de la propia célula interaccionarían con moléculas presentes en la superficie del exosoma); 2) fusión de membranas (este mecanismo fue comprobado mediante el marcaje fluorescente de lípidos presentes en la membrana de exosomas de monocitos, observándose como tras la incubación con plaquetas activadas aparecía fluorescencia en la membrana de dichas plaquetas); 3) fagocitosis (proceso que requiere la presencia de receptores tipo opsonina en la membrana de las células receptoras); 4) macropinocitosis dependiente de Na⁺ y de la activación de la ruta de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K); y 5) endocitosis mediada por receptores que requiere de la presencia de un ligando en la superficie del exosoma para que se acople a receptores específicos de la célula receptora siendo necesaria la activación de la ruta ERK1/2 MAP quinasa.^{78,79,80}

Respecto a las funciones desempeñadas por estas vesículas, estudios previos han indicado un papel crucial en procesos celulares relacionados con la transmisión de señales a través de la interacción de unas células con otras mediante receptores específicos, siendo claves en funciones implicadas en procesos de inflamación, coagulación y diseminación tumoral. Estudios recientes han relacionado estas vesículas con otras funciones importantes que incluyen la transmisión de ARN a diferentes células diana del organismo. Por ejemplo, Valadi y *cols.*, demostraron que los exosomas derivados de mastocitos están enriquecidos en mRNA y miRNA, transportando este material genético a mastocitos adyacentes, que son capaces de traducirlo, indicando que el ARN transferido es biológicamente activo. Además, se vio que este ARN no era capturado por linfocitos T, sino por otros mastocitos.⁸¹

La comunicación intercelular entre las diferentes células del organismo tanto a nivel local como distal (de unos órganos a otros) es esencial y fundamental para su correcto desarrollo y funcionamiento. Existen multitud de moléculas químicas implicadas (de manera directa o indirecta) en la comunicación celular.⁸² Aunque inicialmente los exosomas se consideraron vesículas colectoras de desechos celulares, en la actualidad se reconoce su rol central en los mecanismos de comunicación célula-célula. Esta idea está basada en el hecho de que los exosomas procedentes de una determinada célula pueden interaccionar con otras células a través de receptores específicos dando lugar

1. Introducción

a una estimulación directa en la célula diana transfiriendo receptores de membrana, proteínas funcionales, material genético o factores de crecimiento. Además, se ha observado que el contenido de los exosomas varía en función de la célula que lo genera.⁸³ Por todo ello, actualmente los exosomas se consideran vectores naturales de señalización que juegan un papel esencial en la comunicación intercelular, regulando procesos fisiológicos como la respuesta inmunológica, procesos metabólicos, neurodegenerativos, cardiovasculares o patológicos como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el cáncer.^{84,85,86} El papel principal de los exosomas en estos procesos es servir como vectores naturales de moléculas de señalización a diferentes células diana, pudiendo modificar el metabolismo y las funciones de la célula receptora a través de la información que transporta.⁸⁷ Los exosomas se han encontrado en todos los fluidos biológicos incluidos sangre, orina, leche materna, saliva, semen o bilis.⁸⁸

1.4.2. Exosomas y cáncer

Como se ha comentado, los exosomas juegan un papel importante en diferentes procesos fisiológicos y patológicos de comunicación intercelular, tanto en células normales como malignas. Aunque estas vesículas son secretadas por numerosas líneas celulares, la mayoría de los estudios publicados se centran en los exosomas secretados por reticulocitos, células madre mesenquimales (MSCs), células del sistema inmune y células tumorales.⁸⁷ Múltiples estudios han mostrado que los exosomas derivados de células tumorales pueden afectar al desarrollo y a la evolución del cáncer en diferentes fases.⁸⁹ El contenido de estas vesículas puede inducir y/o inhibir diferentes vías celulares y moleculares que conducen a la alteración del comportamiento celular, regulando procesos como el crecimiento tumoral, desarrollo de metástasis, resistencia a fármacos, angiogénesis o la inhibición del sistema inmune, todos ellos indicadores del avance y un peor pronóstico de la enfermedad. Por ejemplo, Oshima y *co/s.*, indicaron que la cantidad del miARN Let7 en exosomas de células tumorales era significativamente más abundante en exosomas de pacientes con cáncer gástrico metastásico y que esta abundancia estaba asociada a su potencial oncogénico.⁹⁰ También se ha visto que exosomas derivados de células tumorales son los causantes de la reprogramación del entorno y del microambiente tumoral, actuando de forma autocrina sobre las proteínas de las células tumorales, de manera yuxtacrina sobre linfocitos T y de forma paracrina sobre otras líneas celulares como células inmunes, endoteliales, MSCs o fibroblastos.⁹¹ Por tanto, los exosomas no sólo tienen un papel crucial en la interacción entre las diferentes células que componen el tumor, sino también entre las células tumorales y su entorno, favoreciendo la evasión del sistema

1. Introducción

inmune, la generación de nichos pro-tumorales, la angiogénesis o la proliferación celular.⁹² Wang y *cols.*, demostraron que adipocitos sanos que incorporaban exosomas derivados de células de un hepatocarcinoma cambiaban su transcriptoma así como los patrones de secreción de citoquinas y exosomas, generándose un microambiente favorable para la progresión del tumor.⁹³ La **figura 1.7** recoge un esquema que ilustra diferentes procesos reguladores de los tumores y su entorno en los que los exosomas tienen un papel fundamental.

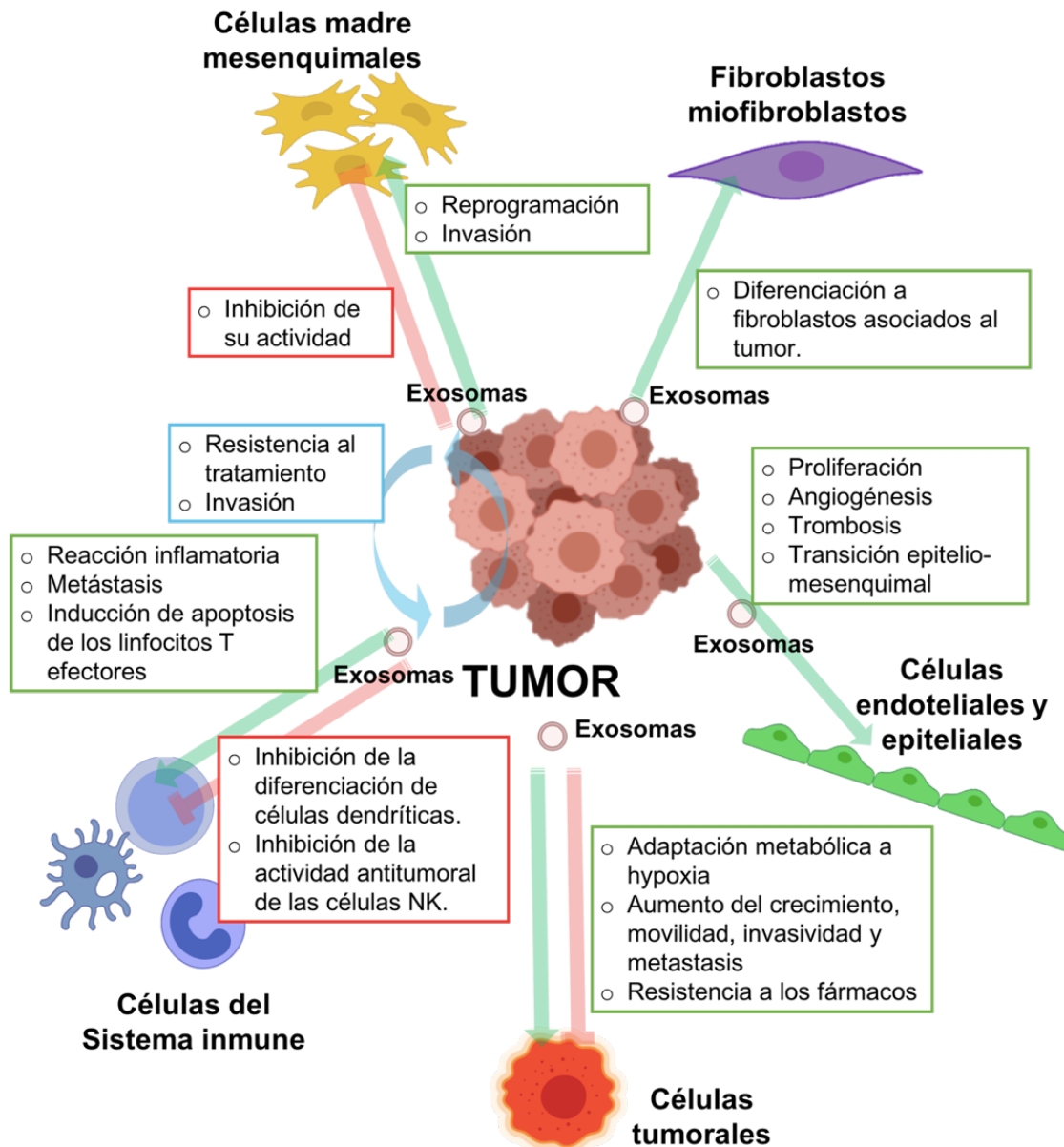


Figura 1.7. Ilustración mostrando diferentes procesos en los que exosomas derivados de células tumorales participan para favorecer la invasión y la malignidad del tumor. (Adaptado de Zebrowska y *cols.*, y Jiang y *cols.*)^{94,95}

Se ha podido observar que exosomas generados por células tumorales, son detectables en la sangre de pacientes con cáncer. De hecho, los niveles de exosomas

1. Introducción

derivados de células tumorales encontrados en sangre son hasta 10 veces superiores a los de las células sanas. Además, estos exosomas tienen un perfil proteico y génico muy específico del entorno tumoral del que derivan, y por tanto su presencia se correlaciona con la progresión tumoral, la supresión de la respuesta inmune, la angiogénesis, la evasión de la apoptosis y/o la aparición de metástasis.⁹⁶ Estas características han potenciado la utilidad de los exosomas como biomarcadores en el diagnóstico del cáncer, ya que podrían ser utilizados como elementos detectables en los fluidos corporales para realizar el pronóstico de un determinado tumor y evaluar su respuesta al tratamiento. En este sentido, se cree que los exosomas ofrecen una alternativa novedosa para desarrollar terapias personalizadas, y así contener el desarrollo de un tumor o incluso su completa eliminación. Además, considerando su implicación en los procesos de transporte y comunicación intercelular, se están diseñando diferentes estrategias encaminadas a modular y modificar la carga de los exosomas para dotarlos de propiedades terapéuticas y/o diagnósticas con el objetivo de ser usados como vehículos selectivos de dichas moléculas a áreas tumorales.^{97,98}

1.4.3. Exosomas como vectores de terapia y agentes de imagen y diagnóstico

Como se ha expuesto, se considera demostrado el papel de los exosomas como mediadores en la comunicación intercelular a corta y larga distancia, transportando información desde la célula de origen a la célula receptora. Además, se ha visto que los exosomas presentan un fuerte tropismo por las células de las que proceden, lo que ha motivado numerosos estudios de su uso como vectores terapéuticos.⁹⁹ Una de las características que convierten a los exosomas en vehículos ideales de moléculas terapéuticas y diagnósticas es su capacidad de atravesar las barreras biológicas como la membrana plasmática y la barrera hematoencefálica. Esta propiedad nos permite transportar selectivamente terapias a ciertas células localizadas en áreas del organismo de difícil accesibilidad como al sistema nervioso central y, en particular, al cerebro.

Algunas de las características más importantes que convierten a los exosomas en excelentes candidatos para transportar fármacos, moléculas, proteínas o ácidos nucleicos, (comparado con otros vehículos artificiales como los liposomas o las partículas poliméricas) incluyen: 1) su presencia y abundancia de manera natural en los fluidos corporales; 2) su estabilidad en condiciones fisiológicas de pH y temperatura; 3) el hecho de que su contenido está protegido por la membrana lipídica; 4) baja inmunogenicidad; 5) baja toxicidad; 6) pequeño tamaño; y 7) capacidad de dirigir su contenido a células diana de manera selectiva y específica gracias a las proteínas y

1. Introducción

lípidos presentes en su membrana, que actúan como huella dactilar. Además, los exosomas pueden ser almacenados y conservados durante largos periodos de tiempo. En dos estudios diferentes, Sokolova y cols., y Kalra y cols., observaron que las vesículas extracelulares eran estables durante 3 meses a 37 °C, 4 °C, -20 °C y -80 °C.^{100,101}

En general, los exosomas se han combinado con moléculas de pequeño tamaño y de carácter lipofílico. No obstante, también se han introducido moléculas más complejas como algunos antioxidantes (p.ej. curcumina), observándose que los exosomas cargados con esta molécula eran capaces de reducir drásticamente la inflamación del cerebro inducida por la presencia del lipopolisacárido bacteriano en un modelo murino.¹⁰² Otros autores han publicado la encapsulación en exosomas de agentes quimioterapéuticos como la DOX o el PTX. Por ejemplo Batrakova y cols., observaron que la encapsulación de DOX en exosomas no sólo reducía los efectos secundarios generados por la administración del fármaco libre, sino que además ofrecía una mejor biodistribución y acumulación en las regiones tumorales comparado con el uso de liposomas artificiales.¹⁰³ Munagala y cols., emplearon exosomas derivados de leche de vaca cargados con whitaferrin A y modificados con ácido fólico para el tratamiento de tumores subcutáneos de pulmón.¹⁰⁴ Tanto el tratamiento con el fármaco libre como cargado en los exosomas, consiguieron la reducción del volumen tumoral. Si bien, el efecto alcanzado con los exosomas cargados fue mucho mayor, atribuyéndose su efecto inhibitorio al aumento de su estabilidad y tiempo en circulación, así como a las propiedades intrínsecas de los exosomas.

Por su parte Haney y cols., abordaron el tratamiento de la enfermedad de Parkinson utilizando exosomas como vectores terapéuticos.¹⁰⁵ Dado que el Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa asociada con procesos de inflamación y con una reducción de enzimas implicadas en procesos redox (catalasa y superóxido dismutasa) en este estudio se internalizó catalasa en exosomas derivados de macrófagos. Se abordó mediante dos estrategias diferentes: 1) transfectando con un plásmido que contenía el gen de la catalasa y posteriormente verificando la presencia de la enzima en exosomas aislados, o 2) mediante técnicas que permitían la incorporación de catalasa directamente en los exosomas aislados. Se observó la localización de los exosomas en el cerebro, consiguiéndose una disminución del estrés oxidativo y un aumento en la supervivencia neuronal tanto *in vitro* como *in vivo*.

Los exosomas también han sido utilizados como vehículos de ácidos nucleicos. Esto podría suponer un gran avance en el campo de la transferencia de ácido ribonucleico de silenciamiento (siARN) y miARN, ya que actualmente no existen

1. Introducción

métodos eficaces para garantizar la entrega de ácidos nucleicos a los tejidos diana. Esto se debe a su rápida hidrólisis, baja biodisponibilidad y a la incapacidad de los ácidos nucleicos para atravesar las barreras biológicas. Las características de los exosomas comentadas, los convierten en candidatos idóneos como vectores de ácidos nucleicos. En este sentido Alvarez-Erviti y *cols.*, fueron pioneros en introducir siARNs en exosomas derivados de células dendríticas de ratón (mediante electroporación) para el tratamiento de Alzheimer.¹⁰⁶ La electroporación también fue el método utilizado por Batrakova y *cols.*, para la incorporación de un miARN en exosomas con el objetivo de inhibir la expresión del receptor-2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) en células tumorales de cáncer de mama.¹⁰⁷

Finalmente, también se está explorando el empleo de exosomas como agentes diagnósticos y como biomarcadores de diferentes patologías. Se ha descrito la participación y el papel crucial de los exosomas en procesos patológicos como el VIH o el cáncer.^{108,109} Debido a la carga selectiva de estas vesículas extracelulares y a la semejanza con sus células de origen, hoy en día se explora su uso como biomarcadores de múltiples enfermedades. Además, dado que se encuentran en fluidos corporales, se consideran agentes ideales para su utilización como herramienta diagnóstica no invasiva. Igualmente, estas vesículas extracelulares se están empleando para vehiculizar moléculas o nanomateriales con propiedades de imagen a zonas de inflamación. Por ejemplo, Lai y *cols.*, conjugaron luciferasa y biotina a estas vesículas extracelulares para generar un sistema de imagen dual con gran sensibilidad para estudiar la estructura y funcionalidad de tejidos *in vivo*.¹¹⁰

1.5. Combinación de exosomas y nanopartículas

La mayoría de estrategias terapéuticas y diagnósticas que emplean exosomas lo hacen en combinación con ARN, proteínas, virus, moléculas terapéuticas o agentes de imagen. Sin embargo, en otras terapias avanzadas, otros materiales como por ejemplo productos derivados de la nanotecnología, también pueden ser incorporados en el interior de estas vesículas.¹¹¹ La combinación del potencial terapéutico y diagnóstico de los exosomas con las propiedades de los nanomateriales abre un campo con prometedoras aplicaciones. Las vesículas extracelulares y en particular los exosomas, proporcionan a la nanotecnología un nuevo vector natural y robusto donde vehiculizar nanomateriales terapéuticos y/o diagnósticos. En particular, propiedades como el elevado tiempo de circulación en sangre, pequeño tamaño, baja inmunogenicidad y la capacidad de direccionamiento a determinadas líneas celulares, hacen de los exosomas vectores ideales como nanovehículos para dirigir productos nanotecnológicos a sus células objetivo.

1. Introducción

En los últimos seis años, varios estudios han investigado la combinación de la nanotecnología con los exosomas.¹¹² En 2014, Alhasan y *col/s.* incorporaron AuNPs conjugadas con un miARN antisentido (anti-miARN21) en exosomas procedentes de células de cáncer de próstata humano PC-3.¹¹³ En primer lugar, se formó el complejo NPs-anti-miARN y se co-cultivo con células tumorales, aislándose sus exosomas. Posteriormente, estas vesículas fueron añadidas a otro cultivo de células de la misma línea tumoral observándose como la expresión de miARN21 se veía notablemente reducida. Así pues, se demostró que los exosomas eran internalizados por las células objetivo liberando su contenido al interior de las mismas. Ese mismo año Hood y *col/s.*, lograron la carga por electroporación de SPIONs de 5 nm en exosomas derivados de células de melanoma humano.¹¹⁴ Dos años más tarde Hu y *col/s.*, describieron el mismo proceso en exosomas procedentes de células de melanoma murino (B16-F10).¹¹⁵ Se demostró su localización en los nódulos linfáticos mediante MRI, utilizando las SPIONs internalizadas como agentes de contraste. Por su parte, Altanerova y *col/s.*, marcaron MSCs con NPs de óxido de hierro recubiertas con carbohidratos, transfectandolas a la vez con un mARN de un gen suicida (citosa deaminasa de levadura::uracil fosforibosil transferasa, yCD::UPRT) capaz de convertir el compuesto no tóxico 5-fluorocitosina en el compuesto citotóxico 5-fluorouracilo. Observaron como las células liberaban las NPs y el gen terapéutico en el interior de sus exosomas y cómo estos eran internalizados exitosamente por células malignas. Además, demostraron su acumulación en las áreas tumorales tras ser administrados intravenosamente *in vivo*, así como su muerte por apoptosis mediada por 1) hipertermia magnética de las MNPs, y 2) la conversión del fármaco no tóxico en 5-fluorouracilo a través del gen suicida incorporado en el exosoma.¹¹⁶ También se han combinado exosomas derivados de células madre de tejido adiposo, células neuronales o macrófagos con SPIONs para desarrollar aplicaciones de imagen y diagnóstico por MRI, así como terapias antitumorales por hipertermia magnética *in vivo*.^{117,118,119,120,121,122} De hecho, la combinación de MNPs con exosomas es uno de los campos más explorados dentro de esta incipiente disciplina, generando un nuevo vector con doble función: es capaz de ser visualizado por MRI y a la vez, tiene un potencial terapéutico en hipertermia gracias a la aplicación de un campo magnético externo *in vivo*.

Además del trabajo realizado por Alhasan y *col/s.* ya citado, otros autores han combinado exosomas con AuNPs para aplicaciones terapéuticas y diagnósticas. Betzer y *col/s.*, marcaron exosomas derivados de MSCs con AuNPs recubiertas con glucosa a través del transportador activo de glucosa GLUT-1. Observaron por imagen CT y por fluorescencia como estos exosomas se acumulaban en regiones del cerebro con daño

1. Introducción

isquémico hasta 24 horas tras su administración intranasal.¹²³ Roma-rodrigues y cols., se sirvieron de AuNPs recubiertas con oligonucleótidos para silenciar selectivamente el gen RAB27A (esencial para la biogénesis de los exosomas), observando una disminución en la secreción de exosomas en las células tratadas.¹²⁴ Por su parte, Lara y cols., han creado un novedoso protocolo para incorporar AuNPs recubiertas con ácido fólico en exosomas derivados de células de melanoma (B16-F10). Tras su administración *in vivo*, se observó una acumulación y un tropismo preferencial hacia pequeños tumores metastásicos comparado con otros órganos.¹²⁵ En otros estudios también se ha realizado bioingeniería en sus membranas para decorar AuNPs con fracciones de la membrana exosomal dotando a estas NPs de propiedades exosomales como elevada estabilidad y direccionamiento celular. Por ejemplo, Khongkow y cols., modificaron la superficie de AuNPs con lípidos funcionales de la membrana de los exosomas conteniendo el péptido de la glicoproteína viral de la rabia (RVG) específica de neuronas, y observaron por bioluminiscencia como estas partículas híbridas se internalizaban exitosamente en neuronas atravesando la barrera hematoencefálica gracias al recubrimiento exosomal.¹²⁶

Illes y cols., combinaron estructuras cristalinas organometálicas (MOFs), esto es, materiales orgánicos cristalinos generados por la asociación de iones metálicos enlazados a través de ligandos orgánicos en estructuras tridimensionales, con exosomas derivados de células HeLa. Se creó un vehículo inteligente capaz de liberar moléculas terapéuticas a demanda.¹²⁷ Zhu y col., desarrollaron una vacuna doble basada en exosomas derivados de células dendríticas contra el melanoma y el cáncer de pulmón.¹²⁸ Para ello, se valieron del papel que juegan los exosomas en la respuesta inmune inducida por NPs, promoviendo la activación de las células T del sistema inmune innato. Esta nueva vacuna estimulaba los linfocitos T y causaba el reconocimiento y rechazo del tumor, proporcionando una nueva terapia basada en exosomas y NPs.¹²⁹

En vista de las numerosas ventajas de la combinación de las aplicaciones terapéuticas y diagnósticas de la nanotecnología, con las características de los exosomas como vectores, es posible que en los próximos años estas estrategias den el paso de consolidarse en el ámbito clínico. De hecho, existen 84 ensayos clínicos que emplean exosomas. Sin embargo, la ausencia de métodos de purificación eficientes, así como la falta de conocimiento que aún existe sobre las interacciones de los exosomas en los sistemas biológicos, son importantes limitaciones que tienen que ser resueltas antes de trasladar este conocimiento desde los modelos animales al ámbito clínico.

En esta Tesis Doctoral se ha intentado combinar la experiencia existente en diversos aspectos de la nanotecnología (síntesis de nanomateriales, exploración de sus

1. Introducción

propiedades ópticas, magnéticas o catalíticas y funcionalización de su superficie), con las capacidades de direccionamiento selectivo de los exosomas para constituir nuevos vectores híbridos capaces de llegar de forma más eficaz a los tumores. El objetivo es abrir nuevas posibilidades para la entrega selectiva de materiales terapéuticos y diagnósticos que permitan superar las bajas eficiencias obtenidas hasta ahora. Esto permitiría diseñar nuevos tratamientos oncológicos con mayor eficacia y reducir los efectos secundarios.

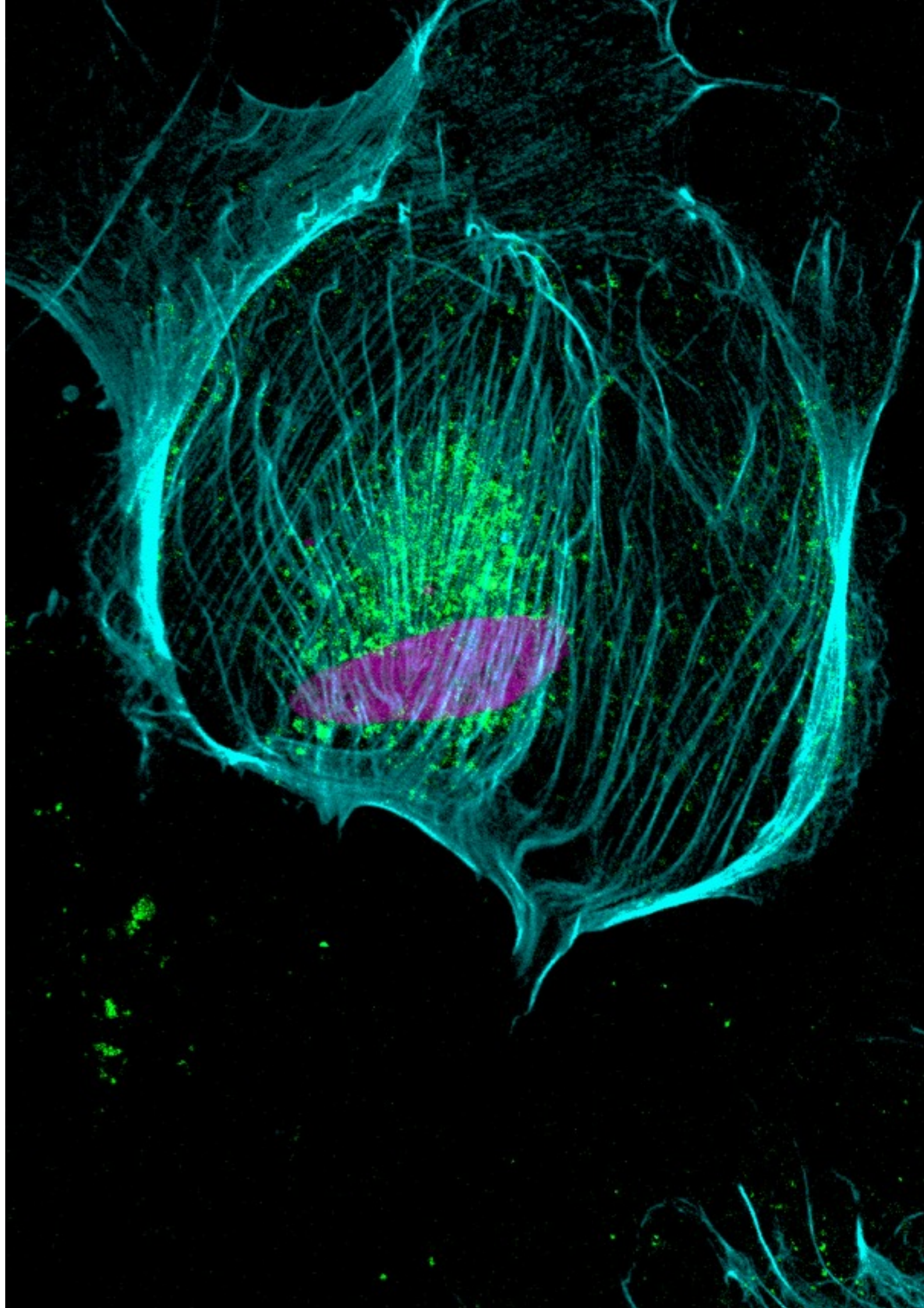


Imagen de microscopía confocal de una célula madre mesenquimal de placenta humana.

Marcaje de actina (cian), endosomas tardíos (verde) y núcleos (magenta)

2. Objetivos

2. Objetivos

En base a los antecedentes mostrados en el capítulo anterior, se planteó como objetivo principal de este trabajo **estudiar la combinación de nanomateriales con diversas funcionalidades con exosomas de distintos orígenes celulares, para desarrollar nuevos abordajes en el diagnóstico y tratamiento del cáncer.**

Para alcanzar este objetivo, se han planteado las siguientes tareas específicas:

1) Desarrollar estrategias dirigidas a encapsular eficazmente nanomateriales y otros agentes de interés dentro de exosomas.

1. Poner a punto métodos que permitan aislar y caracterizar exosomas procedentes de diferentes cultivos celulares.
2. Comparar la eficacia obtenida por las distintas estrategias de encapsulación y optimizarlas para conseguir una carga controlable y reproducible de los nanomateriales deseados dentro de los exosomas.
3. Desarrollar una metodología no invasiva que permita sintetizar NPs de metales nobles directamente en el interior de los exosomas.
4. Encapsular una molécula hidrofóbica (*Perfecta*) con alto contenido en flúor en exosomas con el objetivo de poder monitorizar localización de los mismos *in vivo*.

2) Explorar la aplicación de exosomas modificados en diagnóstico e imagen de áreas cancerosas.

5. Evaluación de los exosomas cargados con *Perfecta* como agentes de imagen por MRI.
6. Estudio de exosomas cargados con PEG-HGNs como agentes de imagen por CT.
7. Diseño de un microdispositivo de captura magnética para la realización de biopsias líquidas mediante el aislamiento de exosomas a partir de sangre de pacientes oncológicos.

3) Explotar las propiedades de estos híbridos de exosomas y NPs para el tratamiento del cáncer.

10. Explorar el potencial terapéutico de exosomas combinados con PEG-HGNs como vectores de hipertermia óptica específicos y selectivos

2. Objetivos

in vitro e in vivo, tanto en tumores definidos, así como en zonas multinodulares.

10. Estudiar el potencial de exosomas cargados con PtNPs como agentes citotóxicos, para aplicaciones terapéuticas oncológicas.
10. Estudiar la viabilidad de exosomas cargados con PdNSs como catalizadores bioortogonales para tratamiento del cáncer.

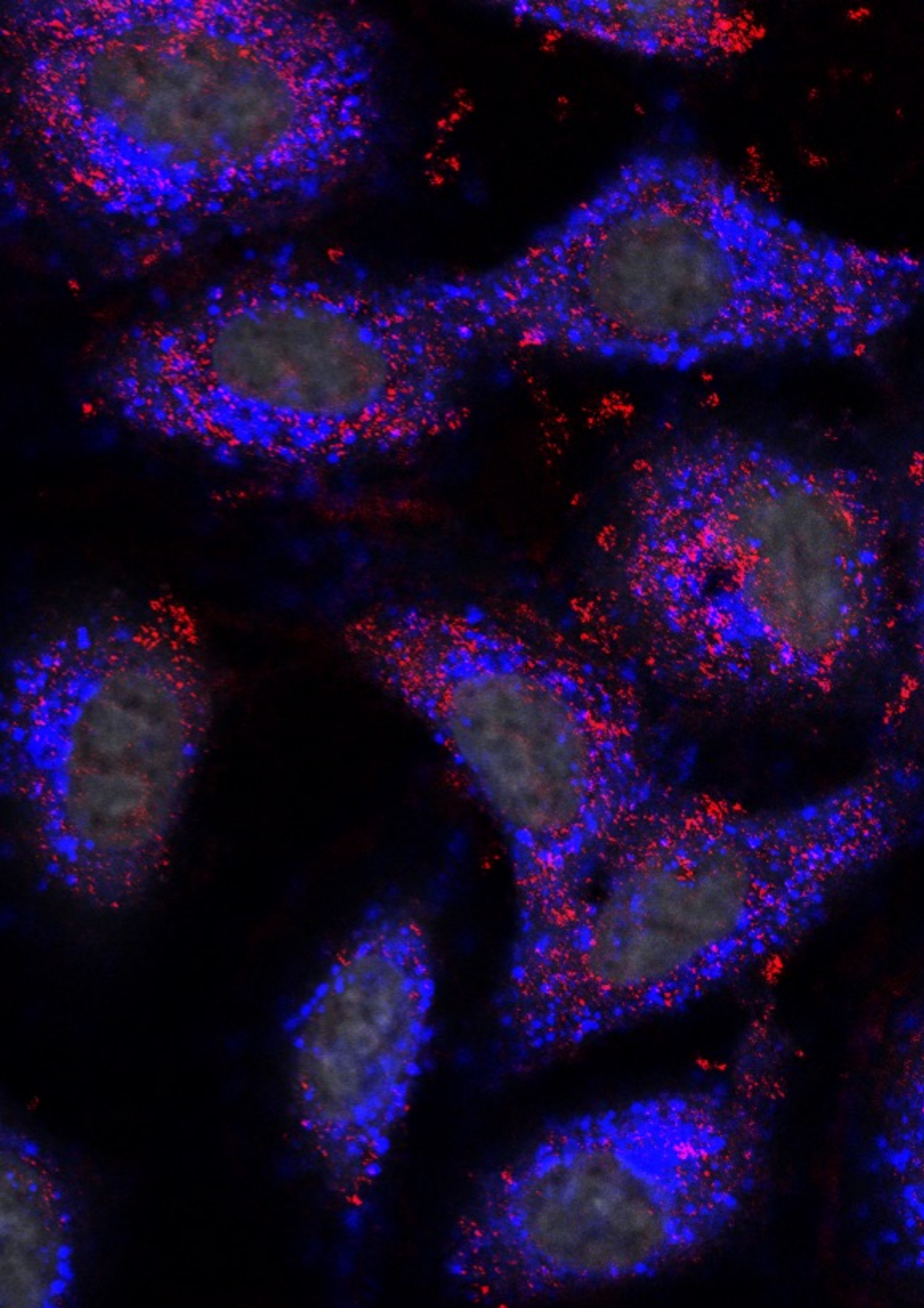


Imagen de microscopía confocal de células de cáncer de pulmón A549.

Marcaje de la ruta endosomal (azul), nanoláminas de paladio (rojo) y núcleos (gris).

3. Materiales y métodos

3. Materiales y métodos

En este capítulo se recogen las técnicas generales empleadas para la caracterización de los nanomateriales sintetizados. También la metodología relacionada con el mantenimiento de los cultivos celulares, los ensayos de citotoxicidad y los estudios de internalización celular. Además, se detallan las estrategias empleadas para el aislamiento y caracterización de exosomas de los cultivos celulares. Igualmente, se hace una breve descripción de los modelos animales empleados en esta Tesis Doctoral. Por último, se detalla el análisis estadístico realizado en los experimentos presentados en esta memoria.

3.1. Caracterización de las NPs

3.1.1. DLS y potencial zeta

La técnica de DLS proporciona información sobre la distribución del tamaño hidrodinámico y sobre la carga superficial (potencial zeta) del material objeto de estudio a partir de la luz dispersada por el mismo. En esta Tesis Doctoral se ha utilizado un equipo Brookhaven 90 plus y el software ZetaPALS (Brookhaven Instruments Co.). La luz incidente se dispersa en diferentes intensidades dependiendo del movimiento browniano de las partículas en suspensión y, analizando estas variaciones de intensidad, se puede obtener el diámetro hidrodinámico de las partículas (proporcional a la velocidad del movimiento browniano a través de la relación de Stokes-Einstein). El diámetro hidrodinámico se corresponde con el tamaño de la partícula más el espesor de la capa de solvatación alrededor de la misma, conocida como doble capa eléctrica.

El potencial zeta es una medida de estabilidad de las partículas. Valores de potencial zeta altos corresponden a una gran repulsión entre las partículas de una dispersión, confiriendo estabilidad. Por lo contrario, cuando el potencial es cercano a cero, las fuerzas de atracción superan a las de repulsión y las NPs tienden a agregarse. El potencial zeta de las NPs se ha obtenido mediante la ecuación de Henry a partir de la movilidad electroforética de las mismas en un campo eléctrico a pH 7-7,4 en una disolución de KCl 1 mM. Las muestras se midieron a temperatura ambiente realizando 3 réplicas de 5 medidas cada una.

La técnica DLS se ha empleado para determinar el potencial zeta de las PEG-HGNs (capítulo 4) así como el potencial zeta y el tamaño hidrodinámico de las Fe₃O₄NPs y funcionalizadas (Fe₃O₄NPs-EDC-NHS-NPs), mostrado en el capítulo 6.

3.1.2. XPS

El análisis XPS es una herramienta de análisis de superficie para medir la composición elemental y el estado químico de los elementos que componen un determinado material. Esta técnica utiliza fotones de rayos X de alta energía para inducir la emisión de fotoelectrones. La energía cinética de estos electrones puede medirse y está determinada por la energía de enlace del electrón expulsado, la cual a su vez depende directamente de la composición elemental y de las características del material. En este trabajo, el análisis XPS se ha empleado para medir composiciones atómicas superficiales y estados de oxidación de los átomos correspondientes.

El análisis XPS se ha realizado con un espectrómetro de rayos X Axis Ultra DLD (Kratos Tech.) para caracterizar la estabilidad de las Fe₃O₄NPs tanto desnudas como funcionalizadas (capítulo 6). Igualmente, también se caracterizaron las PdNSs presentes en el interior de los exosomas (capítulo 5). Las muestras se depositaron sobre cubreobjetos y se dejaron secar a temperatura ambiente. A continuación, se sometieron a una fuente de excitación monocromática de rayos X (Al K α ($h\nu=1486,6$ eV) operada a 16 kV y 10 mA. Para el análisis de las regiones individuales se aplicó una energía de paso de 20 eV. El software CasaXPS se empleó para analizar los espectros obtenidos.

3.1.3. ICP-MS

El análisis por ICP-MS es una técnica altamente sensible capaz de cuantificar los elementos presentes en una muestra a concentraciones muy bajas. En concreto, permite realizar un análisis cuantitativo multielemental de metales, metaloides y no metales hasta concentraciones de ng/mL. En esta técnica, la muestra en forma líquida es transportada hasta el nebulizador donde se transforma en aerosol, que es conducido a la cámara de ionización por plasma acoplado inductivamente donde se vaporiza, atomiza e ioniza. Finalmente, los iones se separan según su relación masa/carga en un analizador de cuadrupolo, siendo contados por un detector de díodos. Las relaciones masa/carga generan información cualitativa mientras que el conteo de iones a las distintas relaciones masa/carga permiten obtener información cuantitativa de los elementos.

Las muestras se diluyeron en ácido nítrico al 1% (69,0-70 % Baker Instra-analyzed, Fisher Scientific) y se digirieron con agua regia. Para calibrar el sistema se utilizaron patrones de Pd con correlaciones excelentes para todos los isótopos ($R=0,9994$ o superiores) y las muestras se midieron por triplicado. Además, se realizó un test *spike recovery* añadiéndose 1,0791 ng/mL de una disolución concentrada de Pd. El análisis ICP-MS se realizó en un equipo perteneciente al Servicio de Análisis Químico

3. Materiales y métodos

de la Universidad de Zaragoza. Se trata de un espectrómetro de masas con fuente de ionización plasma (ICP Pekin Elmer Elan dRC-e), equipado con una celda dinámica de reacción para la eliminación de interferencias espectrales, un nebulizador de flujo cruzado y con una cámara de espray *Scottt Double Pass*. El indio fue empleado como patrón interno para eliminar las fluctuaciones procedentes del proceso de preparación de la muestra, así como de las condiciones experimentales de medida. Esta técnica se empleó para cuantificar la cantidad de PdNSs presentes en el interior de los exosomas mostrados en el capítulo 5. La **tabla 3.1** muestra las condiciones experimentales empleadas en la medición de las PdNSs.

Tabla 3.1. Características de las condiciones experimentales del equipo ICP-MS en la caracterización de las PdNSs.

Flujo gas nebulizador	0,93 l min ⁻¹
Flujo gas auxiliar	1,2 l min ⁻¹
Flujo gas del plasma	15,00 l min ⁻¹
Potencia ICP RF	1200 W
Voltaje de las lentes	5,65 V
Voltaje detector analógico	-1900 V
Voltaje detector pulsos	1350 V
Detector	Dual
Modo del detector	Modo pulsado
Isotopos medidos	¹⁰² Pd, ¹⁰⁴ Pd, ¹⁰⁵ Pd ¹⁰⁶ Pd, ¹⁰⁸ Pd, ¹¹⁰ Pd

La cantidad de PEG-HGNs presente en los órganos recogidos en los experimentos con animales del capítulo 8 también se determinó por ICP-MS analizando la cantidad de Au de forma similar al caso anterior.

3.1.4. MP-AES

El análisis por MP-AES, al igual que el ICP-MS definido anteriormente, permite realizar un análisis multielemental de los metales presentes en una disolución, determinando metales, metaloides y no metales hasta niveles de µg/L. En el análisis por MP-AES se genera un aerosol de la muestra a partir de un nebulizador, y las gotas suspendidas llegan al plasma donde se atomizan e ionizan. Estos átomos e iones emiten radiación con una longitud de onda características de cada elemento y con una intensidad proporcional a su abundancia, permitiéndonos hacer un análisis cualitativo y cuantitativo de los distintos elementos que componen una suspensión de partículas. En este trabajo, se empleó un equipo MP-AES Agilent 4100 operado por el software MP Expert y equipado con una fuente de plasma por microondas excitada magnéticamente y con un detector de carga acoplada (CCD) de amplio intervalo.

3. Materiales y métodos

Esta herramienta se ha utilizado para cuantificar la cantidad de NPs metálicas sintetizadas *in situ* en el interior de los exosomas, resultados mostrados en el capítulo 5. El análisis por MP-AES de todas las muestras requirió un tratamiento previo de digestión con agua regia ($\text{HNO}_3 + 3\text{HCl}$). La preparación de dichas muestras para el análisis por MP-AES se detalla en los materiales específicos mostrados en los capítulos posteriores. La recta de calibrado se realizó con patrones de Pd, Pt y Au con concentraciones desde 10 a 0 ppm.

3.1.5. FTIR

La evaluación por FTIR permite estudiar las huellas moleculares de las estructuras químicas. La muestra es irradiada con radiación del espectro infrarrojo y parte de esa radiación es absorbida. Dicha energía de absorción está directamente relacionada con la energía vibracional y rotacional de las moléculas, generando una señal en el detector que representa la huella molecular de las estructuras químicas, proporcionando información estructural de los componentes presentes en la muestra. Finalmente, la transformada de Fourier convierte la información generada por el detector en un espectro interpretable.

La técnica FTIR ha sido empleada para estudiar las estructuras químicas presentes en las Fe_3O_4 NPs desnudas y funcionalizadas (capítulo 6). Las muestras en estado líquido se concentraron e introdujeron directamente en el portamuestras del equipo para su análisis. Los espectros FTIR se obtuvieron utilizando un espectrómetro Vertex 70 de Bruker Optics equipado con un detector sulfato de triglicina deuterado (DTGS) y un accesorio *Golden Gate Diamond*. Los espectros se obtuvieron realizando 200 barridos en un rango de número de onda de entre 600 cm^{-1} y 4000 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} . Finalmente, el análisis de datos se realizó utilizando el software OPUS proporcionado por el fabricante.

3.1.6. TGA

En TGA permite medir la cantidad y la velocidad en el cambio de masa de una material en función de la temperatura en una atmósfera controlada. Con esta técnica se caracterizan los materiales en función de su pérdida o ganancia de peso debido a la descomposición, oxidación o deshidratación. En este trabajo se ha empleado para conocer la proporción de los diferentes componentes orgánicos presentes en las dispersiones de partículas (tanto restos de materiales provenientes de la propia síntesis como polímeros empleados en la funcionalización de las partículas).

3. Materiales y métodos

Con el ensayo TGA, se estimaron los porcentajes de materia orgánica presentes en las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (capítulo 6). Para ello, las muestras se analizaron en estado sólido en una atmósfera de nitrógeno con una rampa de temperatura entre 30 y 850 °C con una velocidad de calentamiento de 20 °C/min. El equipo utilizado fue Mettler Toledo TGA/STDA 851e.

3.1.7. Espectrofotometría UV-VIS

El patrón de absorbancia en la región UV-VIS y NIR está directamente relacionado con la energía de transición de los electrones según su distribución en la molécula. La ley de Beer-Lambert nos permite explicar la alteración de la intensidad de la luz causada por la absorción y/o difusión de ésta al interaccionar con la muestra. En función del material, morfología y tamaño de las diferentes NPs metálicas, se obtienen máximos de absorbancia debido al fenómeno de resonancia del plasmón superficial (SPR).¹³⁰ Es por ello, que el estudio del patrón de absorbancia en la región del UV-VIS y NIR, permite comprobar si las NPs poseen las características morfológicas, el tamaño óptimo y las propiedades de absorción deseadas para cada aplicación.

El patrón de absorbancia UV-VIS de los nanomateriales utilizados en esta Tesis Doctoral, se midió en el rango de 300 a 1100 nm. Las medidas se realizaron en dos espectrofotómetros diferentes: 1) UV-VIS V-67 de Jasco y 2) Cary®50 de Vairan. En todos los casos se tomó como línea base la absorbancia de agua destilada o de tampón fosfato salino (PBS), en función del solvente en el que estaba contenido la muestra.

3.1.8. TEM

En el análisis por TEM se irradia una muestra ultrafina con un haz de electrones para obtener imágenes de la misma. Por su parte, los electrones difractados permiten obtener información relacionada con la estructura cristalina, y la emisión de rayos X característicos proporciona información sobre la composición elemental de la muestra. Los microscopios electrónicos utilizados para caracterizar las NPs en esta Tesis Doctoral pertenecen al LMA del INMA. En concreto se han utilizado los siguientes modelos: FEI Tecnai T20, FEI Tecnai F30 y FEI TITAN analítico (Low-base).

El microscopio T20-FEI puede operar a un voltaje máximo de 200 kDa , y cuenta con una fuente de electrones LaB6 unida a una lente con un objetivo “SuperTwin®” con una resolución de 2,4 Å. Para preparar la muestra, una gota de la disolución las NPs se deposita sobre una rejilla de TEM. Esta rejilla, se coloca sobre un papel desecante favoreciendo la evaporación del disolvente. Las rejillas utilizadas son de cobre con recubrimiento de carbono/Formvar de 2 mm de diámetro. En el caso de querer observar

3. Materiales y métodos

la funcionalización de las partículas con material orgánico, se utiliza ácido fosfotúngstico (PTA) al 3 % como agente de contraste. Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM) se adquirieron utilizando un detector anular de campo oscuro de gran ángulo (HAADF) (STEM-HAADF) en un microscopio XFEG TITAN operado a 300 kV y equipado con un corrector CETCOR con sonda CS de la compañía CEOS, permitiendo la formación de una sonda electrónica de 0,08 nm. Además, la microscopía electrónica permite analizar la composición química de una muestra por un análisis de dispersión de energía de rayos X (EDX) empleando electrones de alta energía. Para ello, se empleó un detector EDAX, el cual permite realizar experimentos de espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) en modo escaneo (FEI Inspect F30).

El tamaño intrínseco de las NPs se evaluó con el programa ImageJ a partir de fotografías de TEM contabilizando al menos 250 eventos. Posteriormente, con el programa estadístico OriginPro® 8, se calcularon las frecuencias relativas y la distribución de tamaños.

3.2. Líneas celulares

3.2.1. Mantenimiento de los cultivos celulares

Como se observa en la **tabla 3.2**, las células con las que se ha trabajado son: B16-F1 y B16-F10 (células derivadas de melanoma de ratón no metastásico y metastásico, respectivamente), HeLa (células derivadas de adenocarcinoma de cérvix humano), A549 (células derivadas de carcinoma de pulmón humano), SKOV3_Luc (células derivadas de carcinoma de ovario humano infectadas de forma estable para expresar luciferasa, cedidas por el Dr. Antonio de la Vieja del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)), hpMSCs (células madre mesenquimales de placenta humana), mMSCs (células madre mesenquimales de médula ósea de ratón), U87-MG (células tumorales de glioblastoma humano), U251-MG (células tumorales de glioblastoma humano) y TPH1 (monocitos humanos derivados de leucemia monocítica aguda).

Todos los medios de cultivo (medio de cultivo Eagle modificado por Dubelcco (DMEM) 4,5 glucosa, DMEM/F12 y RPMI) se suministraron por Sigma Aldrich. Estos medios se suplementaron con suero fetal bovino (FBS) obtenido de Gibco, así como con dos antibióticos (penicilina y estreptomycin) y un antifúngico (anfotericina), suministrados por Biowest. En el caso de las hpMSCs, el medio también se complementó con 5 µg de FGF humano recombinante (FGF-2), obtenido de Peprotech. Todas las líneas celulares se manipularon en una campana de flujo laminar vertical, en condiciones de esterilidad. Además, todas ellas fueron testadas de micoplasma cada

3. Materiales y métodos

mes. En la parte experimental específica de cada capítulo aparece debidamente indicada cada una de las líneas empleadas.

Tabla 3.2. Líneas celulares utilizadas, medio de cultivo, suplementos y condiciones de crecimiento empleadas.

Línea celular	Origen	Medio de cultivo	Suplementos	Condiciones crecimiento
B16-F1	Melanoma humano	DMEM 4,5 g/L Glucosa	1 % Penicilina/ Estreptomicina/Anfotericina 10% FBS	37 °C, normoxia (5 % CO ₂)
B16-F10	Melanoma humano	DMEM 4,5 g/L Glucosa	1 % Penicilina/ Estreptomicina/Anfotericina 10% FBS	37 °C, normoxia (5 % CO ₂)
HeLa	Adenocarcinoma de cérvix humano	DMEM 4,5 g/L Glucosa	1 % Penicilina/ Estreptomicina/Anfotericina 10% FBS	37 °C, normoxia (5 % CO ₂)
A549	Carcinoma de pulmón	DMEM 4,5 g/L Glucosa	1 % Penicilina/ Estreptomicina/Anfotericina 10% FBS	37 °C, normoxia (5 % CO ₂)
SKOV3_Luc	Carcinoma de ovario humano	DMEM 4,5 g/L Glucosa	1 % Penicilina/ Estreptomicina/Anfotericina 10% FBS	37 °C, normoxia (5 % CO ₂)
hpMSCs	Células madre de placenta humana	DMEM 4,5 g/L Glucosa	1 % Penicilina/ Estreptomicina/Anfotericina 10% FBS 10% FGF-2	37 °C, hipoxia (3 % CO ₂)
mMSCs	Células madre de médula ósea de ratón	DMEM/F12	1 % Penicilina/ Estreptomicina/Anfotericina 10% FBS	37 °C, hipoxia (3 % CO ₂)
U87-MG	Glioblastoma humano	DMEM 4,5 g/L Glucosa	1 % Penicilina/ Estreptomicina/Anfotericina 10% FBS	37 °C, normoxia (5 % CO ₂)
U251-MG	Glioblastoma humano	DMEM 4,5 g/L Glucosa	1 % Penicilina/ Estreptomicina/Anfotericina 10% FBS	37 °C, normoxia (5 % CO ₂)
THP1	Monocitos leucemia monocítica aguda humana	RPMI	1 % Penicilina/ Estreptomicina/Anfotericina 10% FBS	37 °C, normoxia (5 % CO ₂)

3.2.2. Congelación y descongelación de células

Para la congelación de las células, se centrifugaron durante 5 minutos a 300 g. Tras el lavado, el *pellet* celular se resuspendió en medio de congelación con dimetilsulfóxido (DMSO), (FBS:DMSO 90:10 v:v). El DMSO actúa como agente preservante, evitando la formación de cristales en la membrana plasmática de las células. El proceso de congelación se llevó a cabo en crioviales de forma gradual: en primer lugar, manteniendo las células en un *criocooler* con isopropanol almacenado en un ultracongelador a -80 °C durante 24 h. Posteriormente, las células se trasladaron a nitrógeno líquido para su almacenamiento final a -195 °C. Para descongelar las células,

3. Materiales y métodos

se realizó el proceso anterior de forma inversa. Si bien, en este caso las células fueron descongeladas de forma rápida, pasando los crioviales del nitrógeno líquido a un baño a 37 °C hasta su completa descongelación. Antes de sembrar las células en placas de cultivos, se realizó un lavado durante 5 minutos a 300 g para eliminar los restos de DMSO provenientes del medio de congelación. Pasadas 24 horas de su siembra, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco.

3.3. Determinación de la citotoxicidad de las NPs

3.3.1. Análisis de citotoxicidad metabólica

La citotoxicidad metabólica de las diferentes partículas y de los diversos vehículos exosomales se determinó mediante el ensayo de Alamar Blue (Thermo Fisher). Una vez sembradas las células en placas de 96 pocillos, estas se dejaron en mantenimiento durante 24 h. La **tabla 3.3** resume la densidad de células óptima de cada línea sembrada en cada pocillo de una placa de 96 pocillos.

Tabla 3.3. Cantidad de células sembradas en cada pocillo de una placa de 96 pocillos.

Línea celular	Número de células por pocillo
B16-F1	4000
B16-F10	4000
A549	1500
U251-MG	4000
U87-MG	2000
hpMSCs	3000
mMSCs	4000

Pasado este tiempo se añadió el nanomaterial de interés a diferentes dosis durante el tiempo deseado (las concentraciones y tiempos de estudio de cada experimento se especifican en los capítulos correspondientes). Posteriormente, las células se lavaron con PBS tres veces y se añadió el reactivo Alamar Blue siguiendo las especificaciones de la casa comercial. Este ensayo colorimétrico nos permite determinar la viabilidad celular midiendo la fluorescencia o absorbancia en función de la actividad metabólica de las células. Está fundamentado en la capacidad de las oxidoreductasas mitocondriales de transformar la resazurina (compuesto azul, no fluorescente y permeable) en resofurina (compuesto fluorescente, ex/em 530/590 nm). Esta actividad mitocondrial es proporcional a la actividad del metabolismo de las células, permitiéndonos cuantificar la fluorescencia producida y relacionarla proporcionalmente

a la viabilidad celular (**figura 3.1**). Las medidas de fluorescencia se realizaron en un lector de placas Synergy HT (Biotech).

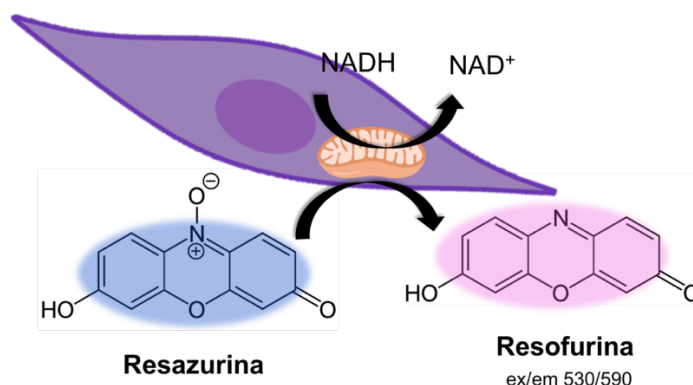


Figura 3.1. Reducción de la resazurina (no fluorescente) a resofurina (fluorescente) por las oxidoreductasas mitocondriales.

3.3.2. Ensayo LIVE/DEAD

Con este ensayo también se ha determinado la mortalidad celular haciendo uso de dos compuestos: 1) calceína AM y 2) homodímero de etidio (EthD-1). La calceína AM es un reactivo no fluorescente capaz de atravesar la membrana de las células vivas. Una vez en el interior celular, se transforma en calceína fluorescente (ex/em 494/517 nm) por las esterasas celulares, las cuales son activas únicamente en células vivas, permitiéndonos visualizar las células viables de manera selectiva. Respecto al EthD-1, se trata de un compuesto fluorescente (ex/em 517/617 nm) capaz de penetrar únicamente en las células con la membrana plasmática dañada y unirse al ADN, permitiendo visualizar únicamente las células muertas de manera selectiva. De manera resumida, se preparó una disolución de calceína AM 2 mM y de EthD-1 4 mM en PBS, que se añadió sobre las células e incubada durante 30 minutos a 37 °C. Por último, las células se lavaron dos veces con PBS y se visualizaron en un microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX81. La proporción de células vivas y muertas también se cuantificada mediante citometría de flujo (citómetro FACSAria BD, BS Bioscience).

Concretamente, el ensayo LIVE/DEAD (Thermo Fihser) se realizó en los experimentos del capítulo 7 para determinar la muerte celular causada por hipertermia óptica mediada por los exosomas derivados de células B16-F10 (Exos^{B16-F10}) y hpMSCs (Exos^{hpMSCs}) cargados con las PEG-HGNs (PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} y PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs}, respectivamente).

3.3.3. Análisis de las fases del ciclo celular

Con el objetivo de evaluar la influencia de las NPs en la proliferación celular de las hpMSCs, se realizó un estudio de las diferentes fases del ciclo celular por citometría

3. Materiales y métodos

de flujo. El ciclo celular es un conjunto de etapas sucesivas que ocurren en la célula durante su crecimiento y división, dando lugar a dos células hijas. Los eventos más notables del ciclo son la división nuclear o mitosis y la división de la célula en dos o citocinesis, las cuales constituyen la fase M (**figura 3.2**).

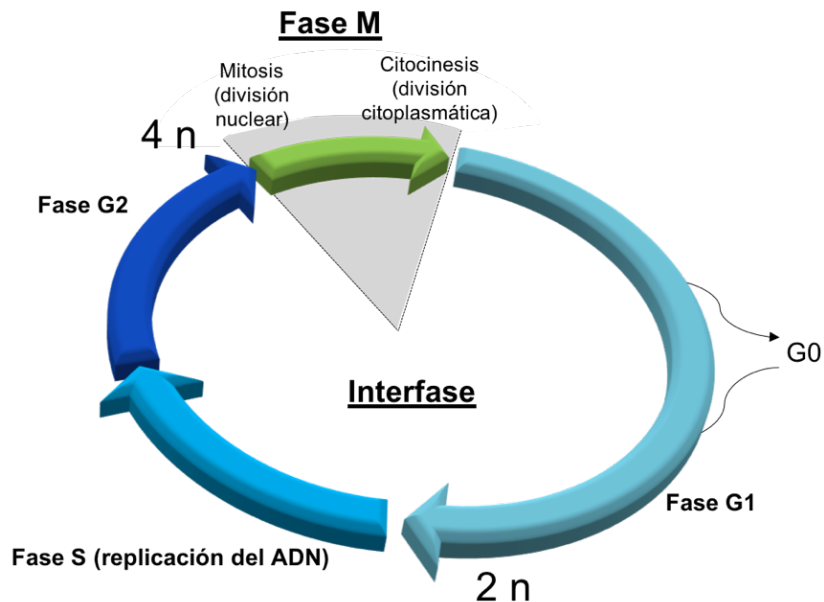


Figura 3.2. Fases del ciclo celular: fase M (compuesta por la división del núcleo (mitosis) y la división del citoplasma (citocinesis)) e interfase formada por la fase G1, S y G2.

Entre dos fases M, ocurre la interfase, un acontecimiento formado por tres etapas. La fase S, es conocida como la fase de síntesis y en ella se produce la replicación del ADN celular, un requisito esencial para la división de la célula. En esta etapa de síntesis, cada cromosoma se duplica, pasando a estar formado por dos cromátidas idénticas. La fase S es precedida y seguida por la fase G1 y la fase G2, respectivamente. Durante la fase G1, fase de *gap* (intervalo), se produce la duplicación de los componentes celulares a excepción del ADN y se produce un aumento del tamaño celular. La carga genética de la célula en esta fase sería $2n$. La fase G1 tiene lugar entre el final de la fase M y el comienzo de la fase S. Finalmente, la fase G2 es el periodo comprendido entre la fase S y el comienzo de la fase M. A final de la fase G2 la célula presenta una carga genética $4n$. En las fases G1 y G2, la célula se encarga de controlar que las condiciones de división sean las adecuadas antes de entrar en la fase S y fase M.

Para evaluar la influencia de las partículas en el ciclo celular, se sembraron las líneas de interés en placas de 6 pocillos (a la densidad celular optimizada para cada una de ellas, indicada en la **tabla 3.4**). Tras 24 h de mantenimiento, las células se incubaron con las NPs a la dosis de interés y durante el tiempo deseado. Pasado este tiempo, las

3. Materiales y métodos

células se lavaron dos veces con PBS y se tripsinizaron. El *pellet* celular se centrifugó con PBS durante 5 minutos a 300 g y se resuspendió en 200 μ L de PBS. Por último, las células se fijaron y se permeabilizaron añadiendo lentamente sobre el *pellet* celular 1 mL de EtOH al 70 % a -20 °C con agitación constante. Antes del análisis en el citómetro, las células se mantuvieron a 4 °C durante al menos 24 h. Pasado este tiempo, se añadió yoduro de propidio (IP) para marcar el ADN celular, y paralelamente, se añadió ARNasa sobre la suspensión celular para eliminar el ARN. El IP es un compuesto fluorescente que se une proporcionalmente al ADN y, por tanto, emite fluorescencia de forma proporcional a la cantidad de ADN. Por ello, considerando que la cantidad de material genético se duplica durante la fase S, la cantidad relativa de células en fases G1, S, G2 y M puede determinarse dado que la fluorescencia de las células en fase G2/M es dos veces superior a la de las células en fase G1. Finalmente, las células se analizaron en un citómetro FACSAria BD (BS Bioscience). Los porcentajes de células en las diferentes fases del ciclo celular se analizaron simultáneamente en suspensiones celulares tratadas con PEG-HGNs (capítulo 4) y en células sin tratar.

Tabla 3.4. Cantidad de células sembradas en cada pocillo de una placa de 6 pocillos.

Línea celular	Número de células por pocillo
B16-F1	250000
B16-F10	250000
U251-MG	300000
hpMSCs	200000
mMSCs	300000

3.4. Evaluación de la internalización de las NPs

3.4.1. Inmunocitoquímica y microscopía confocal

La capacidad de internalización de los diferentes nanomateriales empleados a lo largo de esta Tesis Doctoral, así como su distribución y vehiculización en el interior celular, se evaluó por microscopía confocal. En concreto, se han utilizado dos microscopios confocales pertenecientes al Servicio Científico Técnico de Microscopía e Imagen del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS): 1) microscopio confocal espectral Leica TCS SP2 y 2) microscopio confocal espectral Zeiss LSM 880 con Airyscan.

En primer lugar, las células se sembraron sobre un cubreobjetos de 20 mm (previamente dispuesto en una placa de 24 pocillos) y se cultivaron durante 24 h (la densidad de células por pocillo en una placa de 24 pocillos se resume en la **tabla 3.5**).

3. Materiales y métodos

A continuación, se añadieron las NPs de interés y se mantuvieron en contacto durante diferentes tiempos en función del estudio a realizar (datos detallados en los capítulos posteriores). Seguidamente, las células se lavaron dos veces con PBS para eliminar el material no internalizado y se fijaron durante 20 minutos a temperatura ambiente con paraformaldehído (PFA) al 4 %. Finalmente se realizó un marcaje de inmunofluorescencia para visualizar las diferentes estructuras subcelulares.

Tabla 3.5. Cantidad de células sembradas en cada pocillo de una placa de 24 pocillos.

Línea celular	Número de células por pocillo
B16-F1	25000
B16-F10	25000
A549	20000
U251-MG	30000
hpMSCs	20000
mMSCs	25000

La inmunofluorescencia es una técnica de inmunomarcación que hace uso de anticuerpos conjugados a sustancias fluorescentes para demostrar la presencia de ciertas dianas de interés. Esta técnica se ha utilizado en combinación con otras metodologías de coloración fluorescentes que no hacen uso de anticuerpos. En general, en esta Tesis Doctoral se ha usado DRAQ5 para observar los núcleos, faloidina-Alexa488 o faloidina-Alexa546 para visualizar los filamentos de actina citoplasmáticos, anti-CD63-Alexa488 para observar la ruta endosomal y lysotrackerTM (Thermo Fisher) para observar los compartimentos lisosomales. Dado que en este trabajo se ha trabajado mayoritariamente con NPs inorgánicas, éstas se han visualizado directamente por reflexión de la luz incidente. La **tabla 3.6** recoge las sondas y/o anticuerpos fluorescentes empleados para el marcaje de los diversos compartimentos celulares antes de ser visualizados bajo el microscopio confocal.

Tabla 3.6. Sondas fluorescentes y anticuerpos utilizados en el inmunomarcaje para Microscopía confocal.

Fluoróforo	Diana	Excitación (nm)	Emisión (nm)
Anti-CD63	Ruta endosomal	490	525
Lysotracker TM	Lisosomas	504	511
Faloidina	Filamentos de actina	495	518
Faloidina	Filamentos de actina	556	570
DRAQ5	Núcleos	647	670
-	NPs	Reflexión	Reflexión

3. Materiales y métodos

Previamente a la realización del marcaje, se ensambló la cámara húmeda para llevar a cabo la inmunomarcación. A continuación, los cubreobjetos con las células adheridas en su superficie se lavaron tres veces con tampón fosfato salino con albúmina sérica (PBS-BSA) 1 % (p/v) y otras tres veces con tampón fosfato salino con albúmina sérica con saponina (PBS-BSA-saponina) 0,1 % (p/v). La saponina es un agente permeabilizador que crea poros en la membrana celular, permitiendo la entrada de los fluoróforos al interior de las mismas. La faloidina y el anti-CD63 se diluyeron en PBS-BSA-saponina a concentración 1/200 y 1/250, respectivamente, y se pusieron en contacto con el cubreobjetos conteniendo las células durante 1 hora en oscuridad en la cámara húmeda. Seguidamente, los cubreobjetos se lavaron con PBS y agua destilada y se montaron sobre portaobjetos con 5 μ L de medio de montaje Fluoromont-G (Thermo Fisher) conteniendo DRAQ5 para marcar los núcleos. En último lugar, se dejaron secar los cubreobjetos antes de sellarse. Las muestras se visualizaron en los microscopios confocales mencionados anteriormente. Para garantizar la localización de las NPs en los diferentes compartimentos celulares objeto de interés, se realizaron proyecciones ortogonales a partir de las adquisiciones en dirección Z.

3.4.2. MP-AES

La cantidad de partículas presentes dentro de las células se cuantificó por MP-AES mediante la determinación del contenido de Au como se ha descrito anteriormente. En concreto, esta metodología se ha empleado para cuantificar la cantidad de HGNs y PEG-HGNs en células B16-F10 y células hpMSCs (mostrado en el capítulo 4). El análisis por MP-AES de las diferentes muestras celulares incubadas con las NPs, requirió de un lavado previo con dH₂O antes de la digestión con agua regia (HNO₃ + 3HCl). La preparación de los diferentes *pellets* celulares objeto de estudio se detalla en los capítulos posteriores correspondientes. La recta de calibrado se realizó con el patrón de Au con un rango de concentraciones desde 20 a 0 ppm.

3.5. Aislamiento de exosomas por ultracentrifugación

3.5.1. Obtención del medio ULTRACEN

Para purificar los exosomas producidos por las diferentes poblaciones celulares, éstas se mantuvieron en crecimiento a las condiciones óptimas para cada una de ellas (**tabla 3.2**), si bien el medio empleado se enriqueció con FBS sin exosomas (denominado ULTRACEN). Para eliminar los exosomas presentes naturalmente en el FBS, éste se ultracentrifugó durante una noche (12 horas), a 100000 g y a 4 °C.

3.5.2. Aislamiento de exosomas de cultivos celulares

El aislamiento de los exosomas a partir de cultivos celulares se llevó a cabo siguiendo una estrategia de ciclos sucesivos de ultracentrifugación. En primer lugar, las células se sembraron en placas p100 o p150 hasta alcanzar un 80 % de confluencia en su medio y condiciones de cultivo correspondientes (**tabla 3.2**). Posteriormente, el medio de cultivo se cambió por medio de cultivo ULTRACEN (suplementado con los antibióticos y antifúngicos y con FBS libre de exosomas) y las células se incubaron durante 48 horas más con este medio antes de proceder a la purificación de los exosomas secretados por las mismas. Pasado este tiempo, se recogieron los sobrenadantes de las placas en tubos de centrifuga, y se comenzó el protocolo de aislamiento esquematizado en la **figura 3.3**.

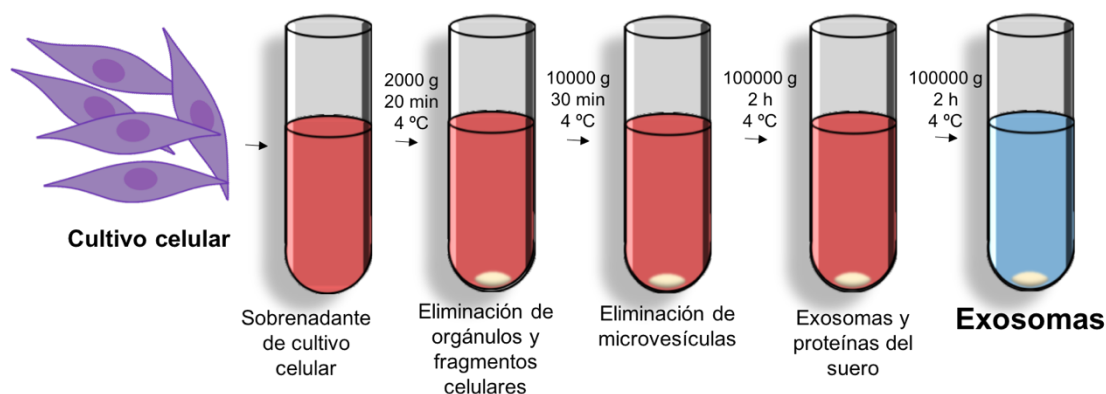


Figura 3.3. Esquema del proceso de aislamiento de los exosomas a partir de cultivos celulares siguiendo un método basado en rondas sucesivas de ultracentrifugación.

En primer lugar, y con el objetivo de eliminar los fragmentos y los orgánulos celulares, las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 2000 g a 4 °C. Tras este ciclo, se descartó el *pellet*, y el sobrenadante obtenido se sometió de nuevo a una centrifugación a 10000 g durante 30 minutos a 4 °C. En esta centrifugación se consiguieron eliminar las microvesículas de mayor tamaño presentes en las muestras. Posteriormente, se recogió el sobrenadante y se ultracentrifugó a 100000 g durante 2 h a 4 °C, obteniéndose un *pellet* de exosomas y proteínas del suero. Con el fin de eliminar las proteínas séricas, el *pellet* exosomas se lavó en PBS mediante otra ronda de ultracentrifugación (100000 g durante 2 h a 4 °C). El *pellet* final de exosomas se resuspendió en PBS y se almacenó para su posterior análisis.

3.6. Caracterización de los exosomas

La caracterización de los exosomas se llevó a cabo por las técnicas que se detallan a continuación, siempre en presencia y en ausencia de los nanomateriales correspondientes.

3.6.1. Cuantificación de proteína total por BCA

El ensayo del ácido bicinconínico (BCA), se utilizó para cuantificar los exosomas en forma de proteína total. Este ensayo está basado en la formación de un complejo proteína- Cu^{2+} , seguido de la reducción del Cu^{2+} a Cu^+ en condiciones alcalinas (**figura 3.4**).

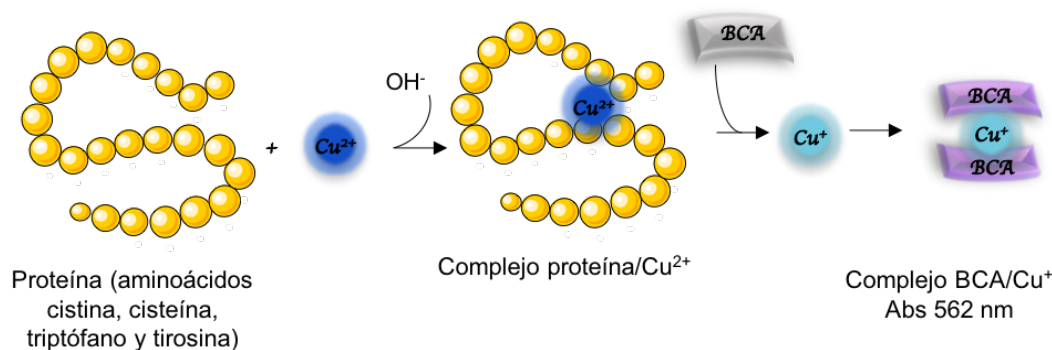


Figura 3.4. Esquema general de la reacción que ocurre en el ensayo BCA para cuantificar la cantidad de proteína total.

Esta reacción es proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra y se fundamenta en la capacidad de reducción de la cadena peptídica y de cuatro aminoácidos (cisteína, cistina, triptófano y tirosina). Finalmente, el ácido bicinconínico (reactivo cromogénico) se une específicamente al Cu^+ formando un complejo estable de color azulado-morado, que absorbe a 562 nm. Por tanto, la absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la solución, la cual puede ser obtenida por comparación con una recta patrón de estándares de concentración conocida (0-2000 $\mu\text{g/mL}$) realizada con albúmina sérica (BSA). Los estándares y la muestra se añadieron en una placa de 96 pocillos, y se incubaron con la solución de trabajo conteniendo el BCA durante 30 minutos a 37 °C siguiendo las especificaciones de la casa comercial (Thermo Fisher). Finalmente, se procedió a la lectura de la absorbancia a 562 nm utilizando un lector de placas Synergy HT.

3.6.2. TEM

La morfología y el tamaño de los exosomas, tanto en presencia como en ausencia de partículas, se evaluaron principalmente mediante TEM convencional con el microscopio TEM FEI TECNAI T20 operado a 200 kV. Para ello, una gota de la disolución de exosomas (en PBS) se depositó sobre una rejilla de cobre con recubrimiento de carbono/Formvar. Además, para poder visualizar los exosomas, se utilizó PTA al 3 % (p/v) como agente de contraste negativo, que fue añadido sobre la

3. Materiales y métodos

muestra depositada en la rejilla. Para calcular el tamaño intrínseco de los exosomas, éste se midió en 250 entidades a partir de las microfotografía de TEM con el programa informático ImageJ, y posteriormente se realizó un análisis estadístico con el programa OriginPro, calculando las frecuencias relativas y realizándose un diagrama de dispersión con un ajuste gaussiano.

En el capítulo referente a los exosomas cargados con las PdNSs, estos fueron inmovilizados criogénicamente en rejillas para ser observados por criomicroscopía electrónica de transmisión (crioTEM). Esto requirió un proceso de congelación de la muestra extremadamente rápido para llegar al estado vítreo. Para ello, una fina película de la muestra se vitrificó utilizando Vitrobot (FEI) con etano líquido. Posteriormente, el portamuestras conteniendo la rejilla se mantuvo bajo condiciones criogénicas con nitrógeno líquido. Finalmente, las muestras fueron visualizadas mediante la técnica de crioTEM en el microscopio Tecnai T20 (FEI) operado a 200 kV.

Además, en algunos capítulos se observaron los exosomas por STEM-HAADF en el microscopio Titan Low Base (FEI) tal y como se ha detallado anteriormente. El análisis EDX empleando electrones de alta energía permitió analizar la composición química de las nanoestructuras generadas directamente en el interior de los exosomas tras el tratamiento con CO (capítulo 5). Para ello, se empleó un detector EDS (EDAX), que permite realizar experimentos EDS en modo escaneo (FEI Inspect F30).

3.6.3. Análisis de proteínas por WB

La evaluación de la expresión de proteínas específicas en los exosomas (con o sin partículas) se realizó mediante un ensayo WB. El WB permite separar proteínas en un gel de poliacrilamida, y posteriormente, transferir dichas proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa, sobre la cual se incuban anticuerpos específicos que reconocen las proteínas de interés permitiendo su detección. Por tanto, esta técnica se puede dividir en cuatro fases principales: obtención de la muestra, electroforesis, transferencia e inmunodetección.

Para la obtención de la muestra, en primer lugar, se extrajo la proteína total de los exosomas. Para ello, una vez aislados exosomas y/o cargados con las NPs, se precipitaron con acetona fría en proporción 1:1 (v:v), incubándose durante 12 horas a -20 °C. Pasado este tiempo, la muestra se centrifugó a 17000 g durante 30 minutos, se descartó el sobrenadante, y el *pellet* de exosomas se resuspendió en tampón de lisis para ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) con inhibidores de proteasas y Laemmly™ en proporción 3:1 (v:v). Las muestras se calentaron durante 5 minutos a 95

3. Materiales y métodos

°C para llevar a cabo la desnaturalización de las proteínas y seguidamente, se incubaron durante 15 minutos en hielo antes de ser cargadas en el gel de poliacrilamida.

Para realizar la separación de proteínas en primer lugar se sintetizó el gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) formado a su vez por dos partes: 1) un gel superior concentrador al 4 % de acrilamida y 2) un gel inferior separador al 12 % de acrilamida. La **tabla 3.7** resume los reactivos empleados en la síntesis de los geles concentrador y separador.

Tabla 3.7. Reactivos empleados para sintetizar el gel concentrador y el gel separador empleados en el WB.

	Gel separador		Gel concentrador
Entrecruzamiento	12 %	8 %	4 %
H ₂ O	1,75 mL	2,75 mL	1,606 mL
Tris-HCl 0,37 M Tris, pH=8,8 (concentrador) 1,12 M Tris, pH=6,8 (separador)	1,25 mL	1,25 mL	625 µL
10 % (p/v) dodecil sulfato sódico (SDS)	50 µL	50 µL	25 µL
Acril/Bisacrilamida 40 %	1,5 mL	1 mL	244 µL
10 % Persulfato de amonio (APS) (p/v)	25 µL	25 µL	23,5 µL
N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED)	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL
Volumen total	4,5 mL	4,5 mL	2,5 mL

Tras cargar las proteínas en el gel (25 µg de proteína total), éstas se separaron utilizando un sistema de electroforesis vertical Miniprotean III de Bio-Rad a 100 v (constantes), temperatura ambiente y durante aproximadamente 1 h y 30 minutos (hasta que el frente de bromofenol presente en el tampón Laemmly™ alcanzó el final del gel). Una vez separadas las proteínas, estas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Millipore) a 4 °C, 300 mA (constantes) durante 4 horas. En el gel SDS-PAGE siempre se incluyó un marcador de peso molecular preteñido para poder determinar el tamaño de la proteína de interés.

Finalmente, se realizó la inmunodetección. En primer lugar, se bloqueó la membrana con tampón tris salino (TBS) con un 5 % de leche (p/v) durante toda la noche a 4 °C para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos utilizados en el siguiente paso del WB. Seguidamente, la membrana se lavó tres veces con Tween-TBS 1% durante 10 minutos. A continuación, se procedió a la incubación de la membrana con el

3. Materiales y métodos

anticuerpo primario que reconocía específicamente las proteínas exosomales (CD9, CD63, CD81, TSG10 y ALIX) o proteínas control (calnexina y α -actina). La dilución de los anticuerpos, así como el correspondiente buffer se indica en la **tabla 3.8**.

Tabla 3.8. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en los WB realizados en este trabajo.

Anticuerpo	Diana	Casa comercial	Dilución	Tampón	Especie Huésped
Anti-CD9	CD9	Abcam	1/2000	Tween-TBS 5 % (p/v) leche	Conejo
Anti-CD63	CD63	Invitrogen	1/250	Tween-TBS 5 % (p/v) leche	Ratón
Anti-CD81	CD81	Santa Cruz Biotechnolog y	1/500	Tween-TBS 5 % (p/v) leche	Ratón
Anti-ALIX	Alix	Cell Signaling	1/1000	Tween-TBS 5 % (p/v) leche	Ratón
Anti-TSG101	TSG101	Abcam	1/500	Tween-TBS 5 % (p/v) leche	Ratón
Anti-Calnexina	Calnexina	Abcam	1/1000	Tween-TBS 5 % (p/v) leche	Ratón
Anti- α -actina	α -actina	Sigma Aldrich	1/1000	Tween-TBS 1 (p/v) %BSA	Ratón
Anti-Conejo-HRP	Inmunoglobulina (IgG) conejo	Bioss Antibodies	1/1000	Tween-TBS 1 (p/v) %BSA	Cabra
Anti-Ratón HRP	IgG ratón	Sigma Aldrich	1/12000	Tween-TBS 1 (p/v) %BSA	Cabra

Los anticuerpos primarios se mantuvieron en contacto con la muestra durante 1 h y 30 minutos. Antes de la incubación con el anticuerpo secundario, la membrana se sometió a tres lavados sucesivos (de 15 minutos cada uno) con Tween-TBS 1%. Finalmente, se añadió el anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa de rábano (HRP), Anti-Conejo-HRP y Anti-Ratón-HRP, permitiéndonos su posterior visualización tras la incubación con el sustrato quimioluminiscente de la peroxidasa.

3.6.4. NTA

El análisis por NTA permite la visualización y la determinación del tamaño y la concentración de una disolución de partículas desde 10 a 2000 nm de diámetro, relacionando tanto el movimiento browniano como las propiedades de dispersión de la luz con el tamaño de las mismas y su concentración. Para medir el diámetro de los exosomas, éstos se diluyeron en 500 μ L de PBS con un ratio 1:1000 o 1:5000 (v:v) dependiendo de la concentración inicial de la muestra, ajustándose a los requerimientos

3. Materiales y métodos

establecidos por la casa comercial. En concreto, se utilizó un equipo Nanosight NS500 (Malvern Panalytical).

En algunos de los experimentos realizados durante la estancia predoctoral en la Universidad Politécnica de Milán, se utilizó el equipo NTA 3.2 Dev Build 3.2.16 (Malvern Instrument, Worcesterchire, UK) para evaluar la concentración y la distribución de tamaños de los exosomas cargados con *Perfecta*.

3.6.5. DLS y potencial zeta

El potencial zeta (carga superficial) de los exosomas (a pH=7.4 en una disolución de PBS) se evaluó mediante la técnica de análisis de fase de la difracción de la luz descrita anteriormente, empleando un equipo Brookhaven 09 plus y el software ZetaPALS (Brookhaven Instruments Co). Para realizar el análisis, se utilizó la aproximación de Smoluchowski.

También se midió el diámetro de los exosomas cargados con *Perfecta* en la Universidad Politécnica de Milán, con un equipo DLS Nano ZS (Malvern Instrument, Worcesterchire, UK) equipado un láser rojo de 633 nm.

3.6.6. Microscopía confocal: co-localización con NPs

Para visualizar los exosomas en el interior celular, se realizó un marcaje con el anticuerpo anti-CD63-Alexa488 tal y como se ha detallado anteriormente. Dado que la mayoría de partículas empleadas en esta Tesis Doctoral son NPs inorgánicas, éstas se visualizaron directamente por reflexión de la luz incidente (a excepción de la molécula de *Perfecta*).

Los niveles de co-localización de las NPs en el interior de las vesículas marcadas con CD63 tras diferentes tiempos de estudio se realizó utilizando los microscopios confocales descritos.

3.7. Modelos animales de experimentación

En esta Tesis se ha utilizado como especie animal el ratón (*mus musculus*). En concreto fueron ratones hembra *Bal/c* (*Hsd nu/nu*) de 6-8 semanas de edad suministrados por Envigo. Las ratonas fueron estabuladas en jaulas autoventiladas y mantenidas en ciclos de 12 h luz/oscuridad con acceso a comida y agua *ad libitum* en las instalaciones habilitadas para tal fin en el CIBA. Además, el cuidado, manejo, instalaciones y eutanasia de los animales se realizó de acuerdo con la normativa vigente con respecto a la protección de los animales de experimentación (RD 53/2013), englobada en la Directiva de la Unión Europea 2010/63. En general, la biodistribución y

3. Materiales y métodos

el potencial teragnóstico de los híbridos exosomas-NPs presentados en este trabajo, se ha evaluado en dos modelos animales diferentes (tanto en tumores sólidos como en zonas multinodulares).

3.8. Análisis estadístico

Los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral, se llevaron a cabo por triplicado y están expresados como la media \pm la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 7,04. El nivel de significancia se determinó con un análisis de varianza (ANOVA) *one-way* utilizando el test de comparaciones múltiples de promedios (Tukey's) o el test de rango múltiple Dunnett's. Las diferencias estadísticamente significativas se expresaron de la siguiente forma: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$ y **** $p < 0,00001$.

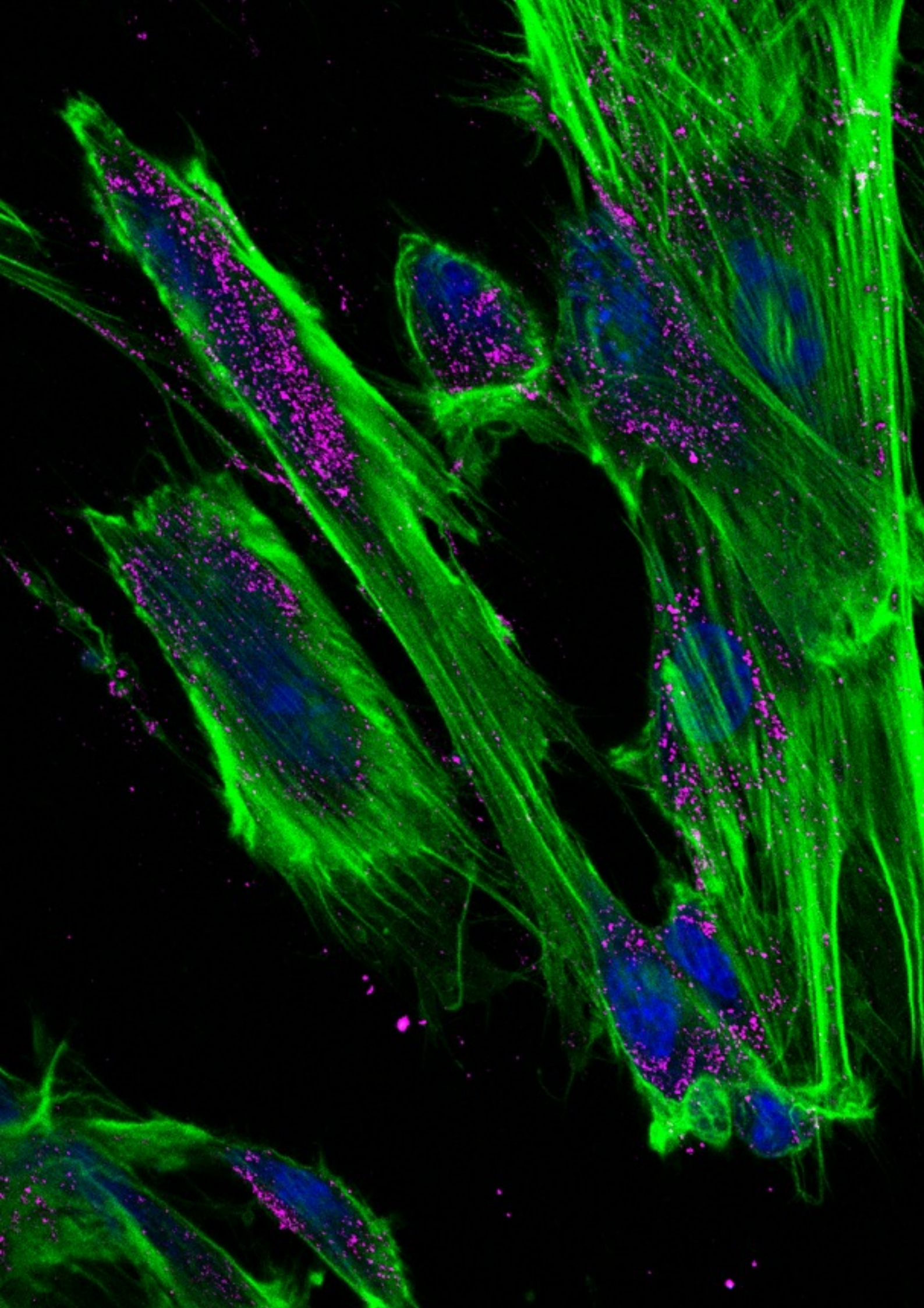


Imagen de microscopía confocal de células madre mesenquimales de placenta humana.

Marcaje de la actina (verde), nanopartículas (magenta) y núcleos (azul).

4. Encapsulación de nanopartículas en el interior de exosomas. Métodos exógenos e incubación con células parentales

4. Encapsulación de nanopartículas en el interior de exosomas. Métodos exógenos e incubación con células parentales

4.1. Introducción

Los avances recientes en el ámbito de la nanomedicina han proporcionado numerosos vectores capaces de transportar diferentes tipos de terapias a tejidos y células diana, tales como partículas de PLGA, liposomas, dendrímeros, partículas poliméricas, estructuras metálicas e inorgánicas, etc.¹³¹ Sin embargo, todavía persisten numerosos obstáculos que dificultan su traslación a la clínica, relacionados especialmente con la falta de conocimiento sobre la toxicidad y las interacciones de los nanomateriales *in vivo*, que pueden dar lugar a efectos sistémicos e inmunogénicos no deseados.¹³² En este ámbito, las vesículas extracelulares y, en particular los exosomas, constituyen nuevos vehículos de naturaleza biológica que resultan especialmente interesantes gracias a sus propiedades, descritas en la introducción de esta memoria (p.ej. tiempo de circulación elevado, pequeño tamaño, baja inmunogenicidad y posible especificidad). Por ello, los exosomas exhiben características muy interesantes como vectores para transportar elementos terapéuticos (p.ej. NPs) a células y tejidos de interés. Además, hoy en día los exosomas se consideran vectores de señalización naturales que juegan un papel crucial en los procesos de comunicación intercelular y en la transferencia de moléculas y señales entre células.⁶⁶ En resumen, los exosomas actualmente despiertan gran interés como vehículos alternativos para entregar NPs con propiedades terapéuticas o de imagen, abriendo un campo novedoso con múltiples aplicaciones en el ámbito de la nanomedicina.

En la última década se han realizado importantes avances centrados en la combinación de productos nanotecnológicos con exosomas.¹¹² Principalmente, se utilizan dos estrategias para incorporar los agentes terapéuticos en el interior de estas vesículas extracelulares: 1) *encapsulación forzada* en exosomas ya secretados y 2) *captación natural* por parte de las células parentales, que incorporan la carga en los exosomas que secretan.

Dentro de los abordajes de encapsulación forzada, se diferencian dos grandes grupos: 1) difusión pasiva y 2) encapsulación activa a través de la creación de poros en

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

la membrana. El método de carga pasiva es la forma más sencilla de incorporar moléculas en el interior de exosomas. En este caso, las partículas, fármacos o moléculas se incuban con los exosomas que previamente se han aislado y se permite su difusión pasiva al interior de la vesícula gracias al gradiente de concentración. Aunque con este método se obtienen eficacias de encapsulación significativamente bajas, hace una década fue la principal estrategia usada para encapsular pequeñas moléculas lipofílicas en el interior de exosomas incubándolos a temperatura ambiente.¹³³ El primer estudio en el que se emplearon exosomas como vectores para liberación de fármacos se desarrolló en 2010. Se encapsuló exitosamente curcumina por incubación pasiva en exosomas derivados de linfocitos T y se observó como la biodisponibilidad y la solubilidad de esta molécula incrementaba significativamente respecto a la molécula libre cuando estaba encapsulada.¹³⁴ Finalmente, se demostró como estos exosomas cargados con la curcumina reducían significativamente la respuesta antiinflamatoria *in vivo* en ratones con sepsis inducida por lipopolisacáridos. Posteriormente, se introdujeron moléculas más complejas (tales como compuestos antioxidantes, moléculas antiinflamatorias o NPs inorgánicas) en el interior de exosomas.^{102,135,126,136,137,138}

Mientras que la encapsulación de moléculas ha podido realizarse con cierta facilidad, la naturaleza sólida de las NPs y su gran tamaño (comparado con el de las moléculas) representan dificultades muy importantes. Es por ello que los métodos de difusión pasiva apenas se utilizan para encapsular NPs en estas vesículas extracelulares y se han desarrollado estrategias de transporte activo basadas en la creación de poros en la membrana exosomal para favorecer la entrada de las partículas en su interior. La aplicación de ultrasonidos (sonicación), de ciclos de electroporación, choques térmicos o la incubación con detergentes son las estrategias más utilizadas para generar poros transitorios en la membrana exosomal.

La encapsulación de MNPs en exosomas por métodos activos, se ha estudiado ampliamente para crear vectores multifuncionales. El híbrido resultante tendría propiedades de agente de contraste para MRI y al mismo tiempo sería un agente terapéutico gracias a las propiedades de hipertermia magnética.¹³⁹ Hood y *cols.*, cargaron SPIONs de 5 nm en exosomas derivados de células de melanoma B16-F10 aplicando pulsos de electroporación en presencia de trehalosa sin modificar su tamaño original y minimizando la agregación de los mismos.¹¹⁴ Esta estrategia fue también empleada por Hu y *cols.*, quienes cargaron NPs similares en exosomas y observaron su acumulación *in vivo* en ganglios linfáticos mediante MRI.¹¹⁵ En otro trabajo, Jia y *cols.*, crearon un vehículo multifuncional con exosomas derivados de células de glioblastoma

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

U251-MG que fueron electroporados en presencia de SPIONs y curcumina. Posteriormente se acopló un péptido dirigido al neuropilo (conjunto de conexiones de axones, dendritas y prolongaciones gliales situada en la corteza cerebral) mediante un enlace entre N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) y N-Hidroxisuccinimida (NHS). Estos exosomas eran capaces de cruzar la barrera hematoencefálica dirigiéndose a células de glioblastoma y se utilizaron por un lado como vectores de hipertermia mediada por las MNPs, y por otro como agentes antiinflamatorios, gracias a la presencia de curcumina en su interior.¹²²

La **figura 4.1** muestra un esquema de los diferentes métodos de encapsulación forzada.

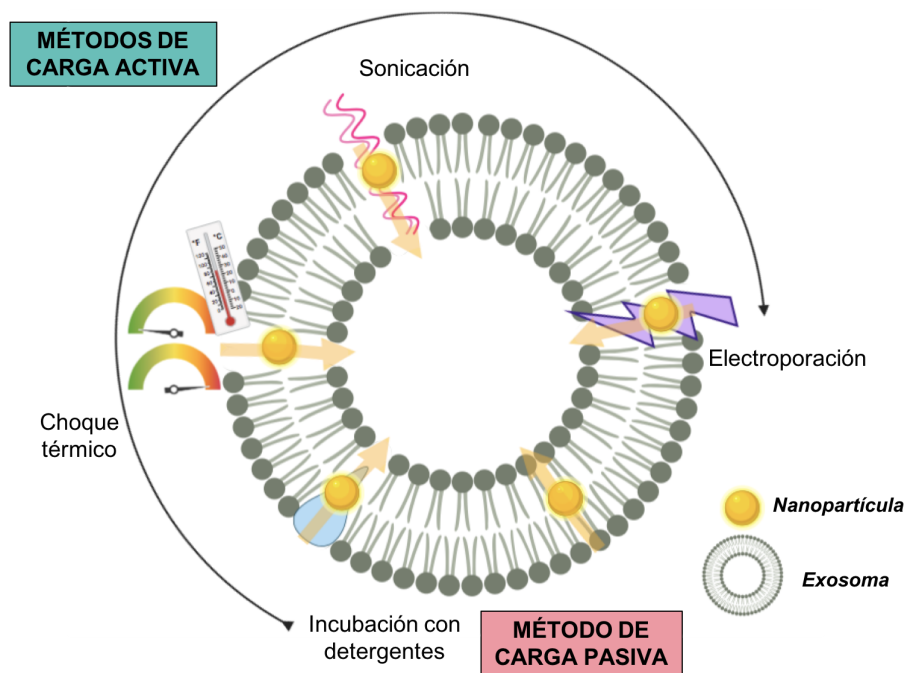


Figura 4.1. Algunos métodos de encapsulación forzada utilizados para introducir NPs en exosomas: carga activa (incubación con detergentes, choque térmico, sonicación y electroporación) y difusión pasiva.

Por último, además de la incubación pasiva y de las estrategias de carga activa, también se pueden utilizar métodos de captación natural de la carga que se desea encapsular. En este caso, las NPs susceptibles de ser encapsuladas se incuban con las células objetivo para favorecer su internalización en las mismas y su incorporación en la ruta de biogénesis exosomal. Así, las NPs serían incorporadas en un endosoma temprano, que posteriormente madurará a un endosoma tardío, sobre el cual se producirán invaginaciones de su membrana para formar un MVB conteniendo las NPs en el interior de estas vesículas. Finalmente, este MVB se fusionará con la membrana plasmática para liberar los exosomas conteniendo las NPs (**figura 4.2**).

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

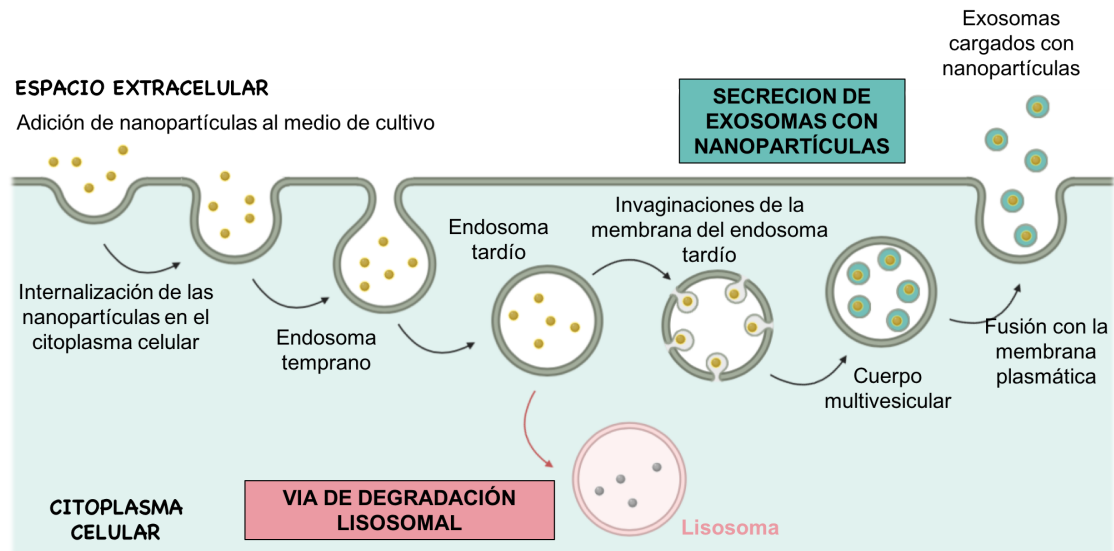


Figura 4.2. Esquema de encapsulación de NPs en exosomas siguiendo el método de captación natural por parte de las células parentales.

Aunque algunos autores sugieren que el método de captación natural no proporciona altos porcentajes de encapsulación, esta es una de las estrategias más empleadas ya que no implica la utilización de métodos exógenos agresivos que puedan dañar o comprometer la membrana exosomal. Altanerova y *co/s.* transfectaron células madre de pulpa dental para introducir un gen (citosa deamilas de levadura::uracil fosforibosil transferasa, γ CD:UPRT) que expresa una proteína capaz de convertir el compuesto no tóxico 5-fluorocitosina en el compuesto citotóxico 5-fluorouracilo. Las células se incubaron con Fe_3O_4 NPs y se obtuvieron exosomas que eran internalizados eficazmente por células tumorales y que tenían una doble capacidad terapéutica: no sólo eran herramientas de hipertermia magnética sino que podían producir la conversión de la molécula inactiva al fármaco citotóxico 5-fluorouracilo.¹¹⁶ En otros trabajos se han usado células madre del tejido adiposo, células neuronales primarias o macrófagos, incubándolos con nanopartículas de óxido de hierro ultrapequeñas superparamagnéticas (USPIOs) o con SPIONs para purificar posteriormente las microvesículas precargadas con estas partículas y emplearlas como agente de contraste por MRI y terapia fotodinámica *in vivo*.^{117, 118, 119}

En lugar de encapsular NPs en el interior de exosomas, otros trabajos las han unido a la superficie de la membrana exosomal. Este es el caso de Qi y *co/s.*, quienes emplearon SPIONs conjugadas a transferrina para purificar exosomas del suero. Los exosomas presentes en la sangre tienen en su membrana un receptor de transferrina a través del cual se unieron específicamente las SPIONs funcionalizadas con esta proteína. Posteriormente se cargó DOX en los exosomas purificados, utilizándolos para el tratamiento de tumores *in vivo* tras la aplicación de un campo magnético externo.¹⁴⁰

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

En una aproximación diferente, Khongkow y *co/s.*, unieron exosomas derivados de células embrionarias de riñón humano (Hek293T) a AuNPs siguiendo un abordaje de extrusión con filtros en serie. Con este método lograron recubrir las partículas con material exosomal, produciendo vectores con capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica y ser internalizados *in vivo* por células cerebrales, mediada por el recubrimiento exosomal.¹⁴¹ También se han combinado exosomas con MOFs para crear sistemas inteligentes y biodegradables de liberación controlada.¹²⁷

Los estudios que se han centrado en combinar exosomas con partículas de oro para desarrollar nuevas terapias y agentes de diagnóstico son escasos. Además del trabajo de Khongkow y *co/s.* ya citado, Betzer y *co/s.*, conjugaron exosomas con AuNPs (5-20 nm de diámetro) recubiertas con glucosa. Este vector fue usado como agente de imagen en cerebro por CT.¹⁴² En otro trabajo, Alhasan y *co/s.*, marcaron células de cáncer de próstata con AuNPs acopladas a un anti-mi21 (implicado en procesos de proliferación y progresión de células cancerosas que está sobreexpresado en varios tipos de tumores). Posteriormente aislaron los exosomas del sobrenadante celular y transfectaron sus células parentales, observando la inhibición selectiva del miR21.¹¹³ Roma-rodriguez y *co/s.*, utilizaron AuNPs recubiertas con oligonucleótidos para silenciar selectivamente el gen RAB27A (crucial para la biogénesis y el procesamiento y liberación de los exosomas), observando la consiguiente disminución de la producción de estas vesículas.¹⁴³ Muy recientemente, Lara y *co/s.*, desarrollaron una estrategia para incorporar las AuNPs en exosomas derivados de células B16-F10 incubándolos con sus células parentales. Para maximizar la incorporación de las NPs a las células secretoras, éstas fueron funcionalizadas con ácido fólico el cual se une a receptores de la membrana celular.¹²⁵

En este trabajo se han encapsulado HGNs de 40 nm de diámetro (capaces de absorber en la región del NIR) en exosomas derivados de células B16-F10 por diferentes métodos fisicoquímicos de encapsulación forzada incluyendo la incubación pasiva (incubación a temperatura ambiente) y la incubación activa (electroporación, sonicación, dos métodos de choque térmico e incubación asistida por saponina) así como induciendo su captación natural por parte de las células parentales. En este capítulo también se compara la eficacia de los distintos métodos de encapsulación de HGNs en exosomas derivados de células madre mesenquimales de placenta (hpMSCs) para usarse como agentes terapéuticos antitumorales *in vitro* e *in vivo* mediante hipertermia óptica. Se ha realizado un estudio del tropismo de los exosomas conteniendo estas NPs hacia sus células parentales, cumpliendo el papel de agentes terapéuticos selectivos basados en hipertermia óptica.

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

Por último, utilizando técnicas análogas a las empleadas con NPs, en la última sección de este apartado se incluye la encapsulación de una molécula altamente hidrofóbica (*Perfecta*) en exosomas derivados de dos líneas celulares. Otro de los principales retos en el campo de las vesículas extracelulares y la nanotecnología, es el uso de los exosomas como vehículos terapéuticos de fármacos, moléculas y NPs con alto carácter hidrofóbico. La alta hidrofobicidad de algunas moléculas y compuestos, así como su interacción preferente con las membranas lipídicas y su baja solubilidad en medios y entornos acuosos, limita su biodisponibilidad y determina su baja eficacia terapéutica, y por tanto su traslación a la clínica.¹⁴⁴ En este punto, los exosomas surgen como vectores no artificiales alternativos a los liposomas, a las partículas poliméricas, a las microemulsiones o a los hidrogeles sintéticos para vehiculizar moléculas y compuestos hidrofóbicos.^{145,146,147,148} En los estudios desarrollados para cargar moléculas hidrofóbicas en el interior de exosomas, se ha observado como el porcentaje de encapsulación depende directamente de la hidrofobicidad del fármaco o la molécula en cuestión.¹³⁴ Y principalmente, se ha descrito la encapsulación de estas moléculas y compuestos en la membrana de los exosomas.

Como se ha comentado anteriormente, algunos trabajos han mostrado el empleo de métodos pasivos y activos para encapsular curcumina, JSI-124 (curcubitacina I) o porfirinas (todos ellos compuestos hidrofóbicos) en exosomas derivados de diferentes líneas celulares.^{134,102} Fuhrmann y *co/s.*, encapsularon porfirinas con diferentes grados de hidrofobicidad en el interior de vesículas extracelulares por varios métodos tanto pasivos como activos (electroporación, difusión mediada por saponina, extrusión o diálisis) y consiguieron porcentajes de encapsulación significativamente superiores a los obtenidos con liposomas convencionales. La encapsulación de las porfirinas en los exosomas resultó en un aumento de la internalización celular y de su efecto terapéutico fotodinámico *in vitro* en células de cáncer de mama mediado por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducida por luz.¹⁴⁹

La molécula *Perfecta* empleada en la última sección de este capítulo está compuesta por 36 átomos de 19-Flúor equivalentes y exhibe un espectro de resonancia con un pico muy intenso y definido (debido a los átomos de flúor equivalentes), lo que permitiría, en principio, localizar los exosomas mediante imagen por resonancia magnética con 19-Flúor (¹⁹F-MRI).¹⁵⁰ La preparación de la emulsión de *Perfecta* así como algunos de los experimentos de caracterización de estos exosomas se realizaron durante la estancia de investigación en el grupo del Prof. Pierangelo Metrangolo de la Universidad Politécnica de Milán, pionero en la síntesis de *Perfecta* y su utilización en diversas aplicaciones.

4.2. Encapsulación de HGNs y PEG-HGNs en exosomas de células B16-F10

Dado que las células metastásicas de melanoma B16-F10 producen gran cantidad de exosomas y éstos han sido ampliamente descritos y caracterizados previamente en bibliografía, se eligió esta línea celular con el fin de diseñar y optimizar la purificación de los mismos, así como para testar y evaluar los diferentes métodos de encapsulación de HGNs en los exosomas empleados en esta Tesis Doctoral.

4.2.1. Experimental

El manejo y mantenimiento de la línea celular B16-F10 se realizó como se ha explicado con anterioridad. Siguiendo el protocolo detallado en el capítulo 3, los exosomas se purificaron a través de ciclos sucesivos de ultracentrifugación, y se caracterizaron mediante TEM, WB, NTA y potencial zeta, siguiendo los procedimientos descritos anteriormente.

4.2.1.1. Síntesis de HGNs y PEG-HGNs y determinación de su estabilidad

Los reactivos utilizados para sintetizar estas NPs fueron: cloruro de cobalto (II) hexahidratado, citrato de sodio tribásico dihidratado, poli (vinilpirrolidona) (PVP) Mm= 55000 Da, ácido cloroáurico (III) (pureza 50 %), borohidruro de sodio y métil-tiol-PEG Mm=1000 Da, todos ellos suministrados por Sigma Aldrich.

Las NPs se sintetizaron siguiendo un protocolo establecido por Preciado-Flores y cols.,¹⁵¹ ligeramente modificado. La **figura 4.3.A** muestra fotografías del proceso experimental de la síntesis de las partículas, así como un esquema de las diferentes etapas de la misma. En primer lugar, 400 mL de agua destilada se pusieron en contacto en un matraz redondo de dos cuellos con 400 µL de una disolución acuosa 0,4 M de cloruro de cobalto (II) hexahidratado y 1,6 mL de una disolución de 0,01M de citrato de sodio tribásico dihidratado con agitación magnética en una atmósfera inerte de argón. En este primer paso, se produce la síntesis de NPs de cobalto que actúan como núcleo sacrificial. Pasados 40 minutos, 2 mL de una disolución de PVP al 0,1 % (p/v) y 0,4 mL de borohidruro de sodio 1 M se añadieron a la mezcla inicial. Durante este paso, se produce un cambio de color de la mezcla de rosa pálido a marrón oscuro, indicando la formación de las partículas de cobalto. En esta etapa, el PVP actúa como estabilizador de las NPs, controlando la morfología de las mismas. De nuevo, la disolución se mantuvo con agitación magnética durante 15 minutos bajo una atmósfera inerte. Posteriormente, 180 µL de ácido cloroáurico 0,1 M se mezclaron con 120 mL de agua destilada y con 360 mL de la dispersión anterior conteniendo las NPs de cobalto (las cuales

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

actúan como núcleo sacrificial para generar las AuNPs). En este momento, ocurre la oxidación de las NPs de cobalto, formándose cloruro de cobalto y óxido de cobalto. Paralelamente, se produce la reducción galvánica del Au^{3+} disuelto, el cual se va depositando en forma Au^0 (oro metálico), obteniéndose las HGNs. En esta etapa final se observa un cambio de color de marrón oscuro a azul turquesa, indicativo de la formación de las HGNs. Las etapas que ocurren en la síntesis de estas NPs se ilustran en la **figura 4.3.B**.

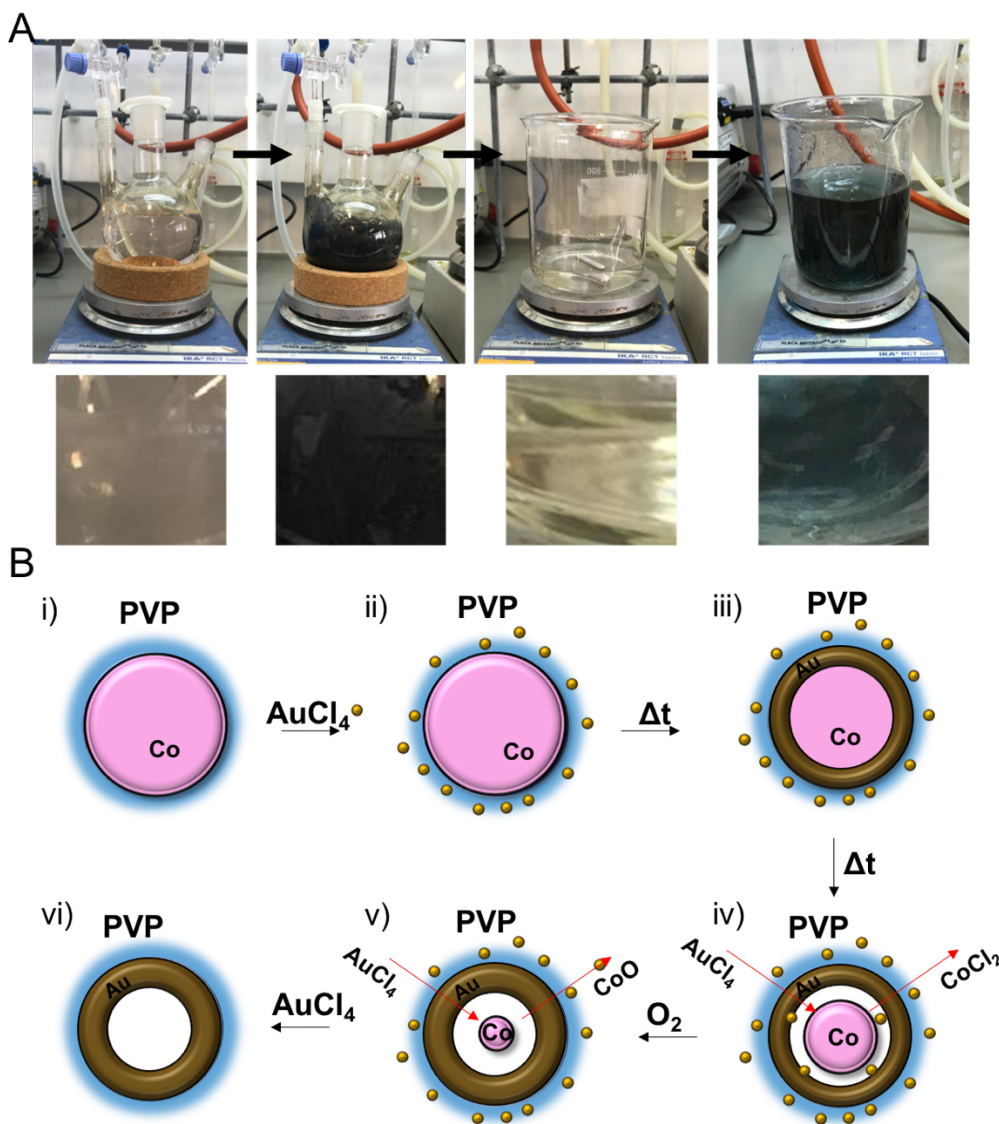


Figura 4.3. A) Fotografías del proceso de síntesis de las HGNs. B) esquema de la síntesis de las HGNs. i) creación de las NPs de cobalto y recubrimiento con PVP; ii) inicio de la deposición del ácido cloroáurico en la superficie de las NPs de cobalto; iii) reducción del Au^{3+} a Au^0 ; iv) inicio de la creación de la corona de oro sobre las NPs de cobalto y oxidación del cobalto; v) oxidación del cobalto remanente y engrosamiento de la corona de oro; y vi) formación de las HGNs.

Con el objetivo de eliminar restos de compuestos sin reaccionar empleados en la síntesis de las partículas (exceso de PVP, cloruro de cobalto y las NPs de cobalto que

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

mg/mL).¹⁵³ Dichas soluciones de NPs fueron agitadas e incubadas tanto a temperatura ambiente como a 37 °C durante 24, 48 y 72 h. Finalmente, se cuantificó la cantidad de proteína adsorbida en su superficie por el método de cuantificación de proteína total BCA descrito en el capítulo 3.

4.2.1.2. Métodos de encapsulación forzada

La encapsulación de HGNs en exosomas derivados de células B16-F10 se realizó por los métodos descritos a continuación. En todos ellos, se mezclaron 10 µg de exosomas previamente purificados con 33 µg de HGNs en un volumen final de 200 µL de PBS. Como control, los exosomas fueron también sometidos a todos los tratamientos en ausencia de NPs con el objetivo de evaluar si dichas estrategias afectaban intrínsecamente a la morfología y funcionalidad de los mismos. La eficacia de encapsulación (porcentaje de exosomas cargados con al menos una partícula) obtenida en cada uno de los abordajes estudiados se calculó a partir de imágenes de TEM cuantificando el porcentaje de exosomas cargados con al menos una nanopartícula a partir de una amplia muestra de imágenes de microscopía electrónica. Además, en todos los experimentos se realizaron al menos tres réplicas independientes. Los métodos empleados han sido:

Incubación a temperatura ambiente (difusión simple)

Los exosomas se pusieron en contacto con una disolución de partículas y se incubaron durante 18 h a temperatura ambiente sin agitación para que las partículas difundiesen pasivamente al interior de las vesículas sin inducir la creación de poros en su membrana.

Incubación con saponina

Es bien conocido que la saponina interacciona selectivamente con las moléculas de colesterol presentes en las membranas, formando poros y/o eliminando dichas moléculas de la bicapa lipídica celular.¹⁵⁴ Por ello, la mezcla de exosomas y partículas se incubó con saponina con el objetivo de forzar la aparición de poros transitorios en la membrana exosomal y por tanto, facilitar la entrada de las NPs en los mismos. Para ello, una vez puestos en contacto los exosomas con las partículas, se añadió la saponina a una concentración final del 0,2 % (p/v).¹⁰⁵ Esta nueva mezcla se incubó durante 20 minutos bajo agitación magnética a temperatura ambiente.

Choque térmico I

En este caso, la mezcla de partículas y exosomas se puso en contacto a -80 °C durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se colocó la disolución a temperatura

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

ambiente. Se repitió este ciclo de congelación-descongelación tres veces consecutivas, esperando que el proceso produjese la formación de poros transitorios ya que la variación de temperatura altera de manera considerable la estabilidad de las membranas lipídicas.

Choque térmico II

Otra alternativa para introducir las HGNs en los exosomas fue utilizar la estrategia clásica de transformación de bacterias de Cohen y cols.,¹⁵⁵ quienes desarrollaron un método de incorporación de material genético exógeno de las bacterias a través de su bicapa lipídica. Para ello, la mezcla de partículas y exosomas se sometió a 42 °C durante 30 segundos, seguido de 2 minutos a 4 °C (temperatura que corresponde a la mayor densidad del agua líquida).

Sonicación

Las condiciones utilizadas en este método se obtuvieron también a partir de los estudios realizados por Haney y cols.¹⁰⁵ El empleo de ultrasonidos con frecuencias superiores a 20 KHz permite desestabilizar las membrana aumentando su permeabilidad de forma transitoria. La disolución de exosomas y NPs se sometió a ciclos de sonicación en baño de hielo utilizando las siguientes condiciones: 500 V, 2 kHz y 6 ciclos de 4 segundos de pulso y 2 segundos de pausa, empleando un sonicador UW 2200 de Bandelin Sonoplus. Seguidamente, se incubó la muestra a 37 °C durante 1 hora con el objeto de permitir el re-ensamblaje de las membranas tras el tratamiento con ultrasonidos.

Electroporación

En este caso la referencia fueron los estudios de Hu y cols. para introducir SPIONS en exosomas.¹¹⁵ La mezcla de exosomas y HGNs se introdujo en una cubeta de ranura de 4 mm y se sometió a electroporación en un electroporador Fenepulser XCell™ de Biorad. La capacitancia empleada fue de 950 μ F y resistencia infinita. Tras la electroporación, se mantuvo la muestra a 37 °C durante 1 hora para permitir el re-ensamblaje de las membranas.

4.2.1.3. Captación natural: incubación de PEG-HGNs con células B16-F10

Antes de llevar a cabo los experimentos de captación natural a través de la incubación de las partículas con las células parentales, se realizaron estudios de la toxicidad de las partículas y de su capacidad de internalización celular con el fin de optimizar las condiciones experimentales que permitiesen maximizar la eficacia de encapsulación.

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

Ensayo de citotoxicidad metabólica

Se llevó a cabo el ensayo de Alamar Blue detallado en el capítulo 3, incubando las células durante 24, 48 y 72 h, con diferentes concentraciones de partículas desnudas y funcionalizadas con PEG (0,5; 0,25; 0,125; 0,06; 0,03; 0,015 y 0,006 mg/mL). Los experimentos se realizaron en triplicado y los resultados se expresan en porcentaje de viabilidad, tomando como 100 % la viabilidad de células no incubadas con las NPs.

Estudio de internalización por MP-AES y microscopía confocal

El análisis de la cantidad de oro presente en el interior de las células B16-F10 se llevó a cabo por MP-AES (capítulo 3). Para ello, las células se sembraron en placas de 6 pocillos y se mantuvieron en cultivo durante 24 horas. Pasado este tiempo, se añadieron 1,5 mL de DMEM completo conteniendo HGNs o PEG-HGNs a una concentración de 0,125 mg/mL (dosis establecida como subcitotóxica). Después de 24, 48 y 72 h, se recogió el medio de cultivo, se tripsinizaron las células, se contaron con ayuda de una cámara de Neubauer y se lavaron 3 veces con PBS (300 g, 5 min). El sobrenadante y el precipitado celular de las diferentes muestras se conservó a 4 °C hasta su análisis. Como control negativo se realizó el mismo procedimiento en células no tratadas. A su vez, como control positivo, se realizó el mismo procedimiento en medio de cultivo conteniendo tanto partículas desnudas como funcionalizadas pero en ausencia de células. Tanto precipitados como sobrenadantes celulares se lavaron una vez más a 10000 g durante 12 minutos y se digirieron con agua regia (HNO₃ + 3HCl) al 10 % en 1,5 mL de agua destilada durante 1 hora antes de ser analizados por MP-AES. Teniendo en cuenta la cantidad de células presentes en cada muestra, así como la concentración de oro obtenida, se estimó la cantidad de oro presente en cada célula individual. Para ello, las partículas se consideraron como esferas huecas de diámetro y grosor conocido y, sabiendo la densidad del oro, pudo determinarse el número de partículas presentes de cada tipo (HGNs o PEG-HGNs). En el caso de las PEG-HGNs el resultado se corrigió por la contribución del PEG a la masa total, obtenida en estudios anteriores por TGA.¹⁵⁶ Los cálculos realizados para calcular el número de partículas para una cierta cantidad de oro, se muestran a continuación:

$$V_{\text{Anillo esférico}} = V_{\text{esfera exterior}} - V_{\text{esfera interior}} = \frac{4}{3}\pi(r_{\text{exte}}^3 - r_{\text{int}}^3)$$

$$\text{Diámetro exterior PEG - HGN} = 44,9 \text{ nm}$$

$$\text{Diámetro interior PEG - HGN} = 38,3 \text{ nm}$$

$$\text{Densidad}_{\text{Au metal}} = 19,3 \text{ g/cm}^3$$

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

Considerando los diámetros de las partículas obtenidos a partir de las imágenes de microscopía electrónica:

$$\begin{aligned} V_{\text{Anillo esférico}} &= V_{\text{esfera exterior}} - V_{\text{esfera interior}} = \frac{4}{3}\pi \left(\left(\frac{44,9}{2} \right)^3 - \left(\frac{38,3}{2} \right)^3 \right) \\ &= 17969,7 \text{ nm}^3 \\ 17969,7 \text{ nm}^3 \cdot \frac{19,3 \text{ g}}{1 \text{ cm}^3} \cdot \frac{1 \text{ cm}^3}{1 \cdot 10^{21} \text{ nm}^3} &= 3,47 \cdot 10^{-16} \text{ g} \\ &= 3,47 \cdot 10^{-7} \text{ ng de Au tiene cada NP} \end{aligned}$$

La captación celular de partículas fue además observada por microscopía confocal. Para ello se siguió el protocolo detallado en el capítulo 3. De forma resumida, las células se sembraron en cubreobjetos estériles (dispuestos en una placa de 24 pocillos). Tras este tiempo, las células se incubaron con medio de cultivo conteniendo HGNs o PEG-HGNs a una concentración de 0,125 mg/mL durante 24 h más. Posteriormente, las células se lavaron para eliminar las partículas no internalizadas y finalmente se fijaron, permeabilizaron y se procedió al marcaje de la actina citoplasmática con faloidina-Alexa-488 y al marcaje de los núcleos con DRAQ5. Los láseres de excitación empleados para visualizar cada fluoróforo se muestran en la **tabla 3.6** y los agregados de NPs fueron observados directamente por reflexión sin necesidad del uso de fluoróforos. La confirmación de la localización de las partículas en el interior celular se llevó a cabo realizando proyecciones ortogonales a partir de las adquisiciones en dirección Z de los diferentes planos de las células.

4.2.1.4. Aislamiento y caracterización de exosomas con PEG-HGNs

Los cultivos celulares se incubaron con medio enriquecido con PEG-HGNs a la dosis subcitotóxica previamente establecida (0,125 mg/mL) durante el tiempo de internalización óptimo (24 h) de acuerdo con los estudios de microscopía confocal y MP-AES. Tras este tiempo, las células se lavaron 3 veces con PBS con el objetivo de eliminar las partículas no internalizadas y se cambió el medio de cultivo a medio ULTRACEN (6 mL de medio por placa). Finalmente, se mantuvieron los cultivos durante 48 h secretando las vesículas y se procedió a la purificación de los exosomas por rondas sucesivas de ultracentrifugación tal y como se ha detallado anteriormente (capítulo 3). La presencia de las PEG-HGNs en el interior de los exosomas, así como la morfología, integridad y funcionalidad de los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} fue estudiada mediante TEM, WB, NTA, potencial zeta, microscopía confocal y electroforesis en gel de agarosa. Algunas de estas técnicas ya han sido descritas en capítulos anteriores (TEM, WB, NTA y potencial zeta), por lo que únicamente se detallan aquí las no presentadas previamente, salvo que el uso de las mismas sea distinto al explicado con anterioridad.

Co-localización de exosomas con PEG-HGNs por microscopía confocal

En los ensayos de co-localización entre los exosomas derivados de células B16-F10 y las PEG-HGNs, los exosomas se marcaron con la sonda PKH67 de Sigma Aldrich (ex/em 490/502 nm). Para ello, el precipitado de exosomas obtenido en la última etapa del ciclo de aislamiento se resuspendió en 1 mL de PBS. Por otro lado, 4 µL de la sonda PKH67 se pusieron en contacto con 1 mL de PBS. A continuación, la disolución de PBS con la sonda se añadió sobre la de los exosomas y se incubaron durante 4 minutos a temperatura ambiente. Para parar la reacción, se añadieron 57 µL de BSA al 35 % (p/v) en PBS y se completó con este solvente hasta llegar a 33 mL (volumen final). Para eliminar el exceso de sonda no conjugado, la disolución de exosomas fluorescentes se centrifugó durante 2h a 4 °C a 100.000 g. El precipitado de exosomas fluorescente se resuspendió en PBS. Tanto los exosomas control (sin NPs en su interior) como los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} se sometieron a este marcaje con la sonda fluorescente. Finalmente, 20 µg de PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} se añadieron a un pocillo de una placa µ-Slide de 8 pocillos (Ibidi), completando el volumen hasta 300 µL de PBS.

Por último, la misma cantidad de exosomas sin partículas se depositó sobre otro pocillo a la vez que 10 µL de PEG-HGNs 0,125 mg/mL. Las muestras se observaron en un microscopio confocal Espectral Zeiss LSM 880 con Airyscan, excitando con un láser de 488 nm los exosomas y viendo directamente por reflexión las NPs (ex/em 488/490 nm). Las proyecciones en dirección Z corroboraron que las partículas se localizaban preferentemente en el interior exosomal.

Ensayo de retención por electroforesis en gel de agarosa

Recientemente, Thakur y *co/s.*,¹⁵⁷ han descubierto la presencia de dsADN de tamaño mayor a 2,5 Kpb asociado a la cara externa de la membrana de exosomas derivados de células tumorales. Aprovechando estos resultados, se analizó la migración en un gel de agarosa de exosomas control y de PEG-HGNs-Exos^{B16-F10}. Debido a la carga negativa de los exosomas (aportada por los fosfolípidos presentes en su membrana lipídica), cabe esperar que los exosomas migren hacia el polo positivo del gel. Pero, además, en el caso de los exosomas conteniendo NPs, el vector tendría un peso mayor (aportado por las partículas), generando un retardo en la migración del exosoma, manifestado por la banda correspondiente al dsADN presente en su membrana externa.

Para estos ensayos, 10 µg de exosomas control (Exos^{B16-F10}) y PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} se dispersaron en un volumen de 15 µL y se mezclaron con 5 µL de buffer

de carga (Takara) antes de su adición al gel (al 1 % de agarosa en tampón tris borato EDTA (TBE) conteniendo SYBER Safe). La electroforesis se realizó durante 45 minutos a 150 V y la migración de los complejos se analizó en una cámara de UV (Biorad ChemiDoc RXS). La visualización del dsADN exosomal es posible gracias a la intercalación del SYBER Safe en la doble cadena del material genético. El SYBER Safe, que no es fluorescente en su forma libre, se convierte en una molécula altamente fluorescente cuando se intercala en el ADN.

4.2.1.5. Estudio de la ruta de secreción exosomal

Parte del desarrollo de esta metodología y, por consiguiente, de los resultados referentes al estudio de la ruta de biogénesis y secreción exosomal de los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} se realizó en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). En concreto, en el laboratorio del Prof. Dr. Francisco Sánchez Madrid se procedió al tratamiento de las células con los diferentes inhibidores de la ruta de biogénesis y de secreción de exosomas.

Para evaluar la implicación de las rutas de biogénesis y de secreción de exosomas en la producción de los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10}, las células B16-F10 se sembraron en una placa de 6 pocillos y se mantuvieron en crecimiento durante 24 horas. Posteriormente estas células se incubaron con las PEG-HGNs a una dosis de 0,125 mg/mL durante 24 h. Las células control, se mantuvieron en cultivo sin incubarse con PEG-HGNs. A continuación, parte de las células control y de las células incubadas con NPs fueron tratadas con manumicina A durante 2 horas a fin de suprimir la secreción de exosomas (la manumicina reduce la endocitosis gracias a la inhibición de la ruta de señalización de Ras en células cancerosas).¹⁵⁸ La otra parte de las células se transfectó con un siRNA-SMART pool Rab27 ON-TARGET plus 250 nM (Dharmacon) usando lipofectamina 2000 tal y como indica el fabricante. Rab27 es una GTPasa que media las fases tardías de la exocitosis de las vesículas en las células.¹⁵⁹ Tras los correspondientes tratamientos con manumicina A o con siRNA-Rab27, se cambió el medio de cultivo por medio ULTRACEN durante 48 horas y se purificaron las nuevas vesículas secretadas por las células en las diferentes condiciones de cultivo (células cultivadas en ausencia de partículas tratadas con manumicina A o transfectadas con siRNA-Rab27; y células incubadas con las partículas tratadas con manumicina A o transfectadas con siRNA-Rab27). El número de exosomas secretados por células sometidas a ambos tratamientos, se comparó frente a los producidos por células no tratadas (tanto en presencia como en ausencia de partículas).

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

Los exosomas purificados fueron caracterizados por TEM y WB, siguiendo los protocolos descritos anteriormente. A partir de las fotos de TEM se realizó un análisis semicuantitativo para estimar el número de exosomas producidos por las células en todas las condiciones del estudio. Respecto al WB, se evaluó la expresión de calnexina y de TSG101.

4.2.1.6. Evaluación de la estabilidad de los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10}

Para evaluar la estabilidad hidrodinámica de los PEG-HGNs-Exos se evaluó su tamaño a partir de fotografías de TEM realizadas tras 7 y 14 días después de su aislamiento y almacenamiento posterior a -20 °C. Además, se determinó la carga superficial de los mismos (potencial zeta) pasados 7 y 14 días de la purificación. La preparación de las muestras para estos experimentos se detalla en la sección de materiales y métodos.

4.2.2. Resultados y discusión

4.2.2.1. Caracterización de las HGNs y PEG-HGNs

En la síntesis de las HGNs por reemplazamiento galvánico partiendo de NPs de cobalto empleadas como núcleo sacrificial, se obtuvieron partículas huecas de oro pseudoesféricas. En las imágenes de TEM mostradas en la **figura 4.5** se puede observar la fina pared de oro en forma de anillo más oscuro alrededor del núcleo hueco de las HGNs. Tras la funcionalización de las HGNs con metil-tiol-PEG, en la **figura 4.5** puede observarse una corona de material orgánico de unos 5 nm de espesor bordeando las HGNs correspondiente con el PEG.

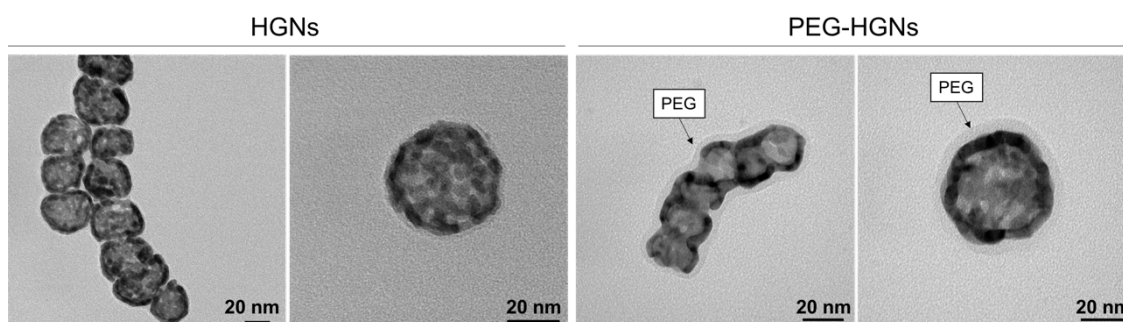


Figura 4.5. Imágenes de TEM de las HGNs (derecha) y de las PEG-HGNs (izquierda). En estas últimas es posible observar la corona de PEG bordeando las NPs.

A partir de las imágenes de TEM, se representaron histogramas de tamaño de ambos tipos de partículas (**figura 4.6**), observándose que las HGNs y las PEG-HGNs presentan un diámetro medio de $38,3 \pm 8,3$ nm y $44,9 \pm 7,6$ nm, respectivamente. Las medidas de potencial zeta de ambos tipos de NPs a pH fisiológico (pH 7), revelaron una

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

carga superficial negativa de $-15,35 \pm 0,84$ mV para las HGNs y $-10,48 \pm 0,35$ mV para las PEG-HGNs.

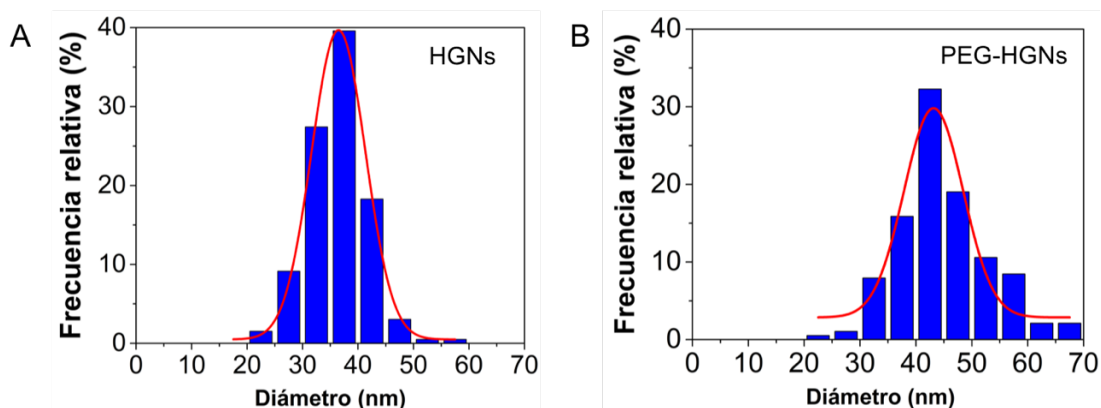


Figura 4.6. Histogramas de distribución de tamaños obtenidos a partir de las fotografías de TEM de las A) HGNs y B) PEG-HGNs.

Las medidas de absorbancia por espectroscopía UV-VIS se realizaron entre 400 y 1000 nm, observándose un pico de máxima absorbancia en la región NIR del espectro electromagnético, en particular alrededor de 808 nm, tanto en las NPs desnudas como funcionalizadas con PEG (**figura 4.7**). Si bien, un pequeño desplazamiento hacia longitudes de onda menores se observó en las PEG-HGNs, atribuido a un posible cambio en el valor de la constante dieléctrica en la doble capa interfacial tras la funcionalización.¹⁶⁰ El máximo de absorbancia es debido al fenómeno SPR, que consiste en la oscilación colectiva de los electrones libre del metal cuando son excitados con la luz. Esta oscilación produce un gran aumento de la absorción y la dispersión de la radiación electromagnética en la zona del espectro correspondiente a la frecuencia SPR. La frecuencia a la que ocurre dicho plasmón es característica del tamaño y de la morfología de las NPs.¹³⁰

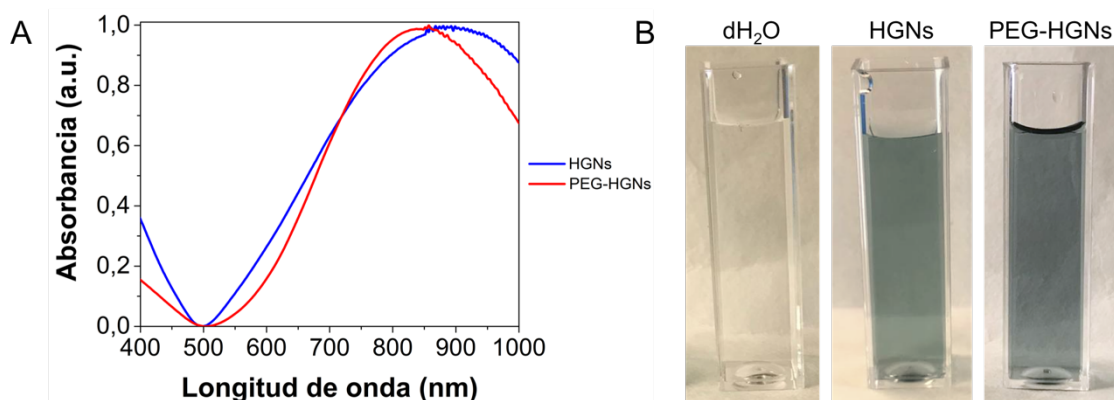


Figura 4.7. A) Espectro de absorbancia obtenido por espectroscopía UV-VIS de las partículas desnudas y funcionalizadas con un máximo de absorbancia alrededor de 808 nm. B) Fotografías de disoluciones de PBS, HGNS y PEG-HGNs en las que se observa el color azul-turquesa de las partículas.

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

En este caso, es crucial obtener dispersiones de NPs con un máximo de absorbancia a en la región NIR, ya que es la zona del espectro donde la luz puede penetrar más profundamente en los tejidos biológicos, posibilitando el uso de estas NPs en aplicaciones de hipertermia óptica. Esto se atribuye al fenómeno conocido como ventana biológica, en el cual en ese rango de longitudes de onda el agua y los cromóforos (p.ej. hemoglobina y desoxihemoglobina) tienen una baja absorbancia.

4.2.2.2. Evaluación de la estabilidad de HGNs y PEG-HGNs

El efecto del PEG en la estabilidad de las NPs, se evaluó con un ensayo BCA para cuantificar la corona proteica generada alrededor de las HGNs y PEG-HGNs en una disolución de PBS-BSA (0,125 mg/mL) en un volumen final de 1 mL, tanto a temperatura ambiente como a 37 °C. La **figura 4.8.A** confirma que, en el caso de las partículas desnudas, la cantidad de proteína total adsorbida en su superficie aumenta a lo largo del tiempo durante 3 días, tanto a 37 °C como a temperatura ambiente. Por lo contrario, la proteína adsorbida en las partículas pegiladas es significativamente más baja comparado con las partículas desnudas y además no se ve aumentada con el paso de los días a ninguna de las dos temperaturas de estudio.

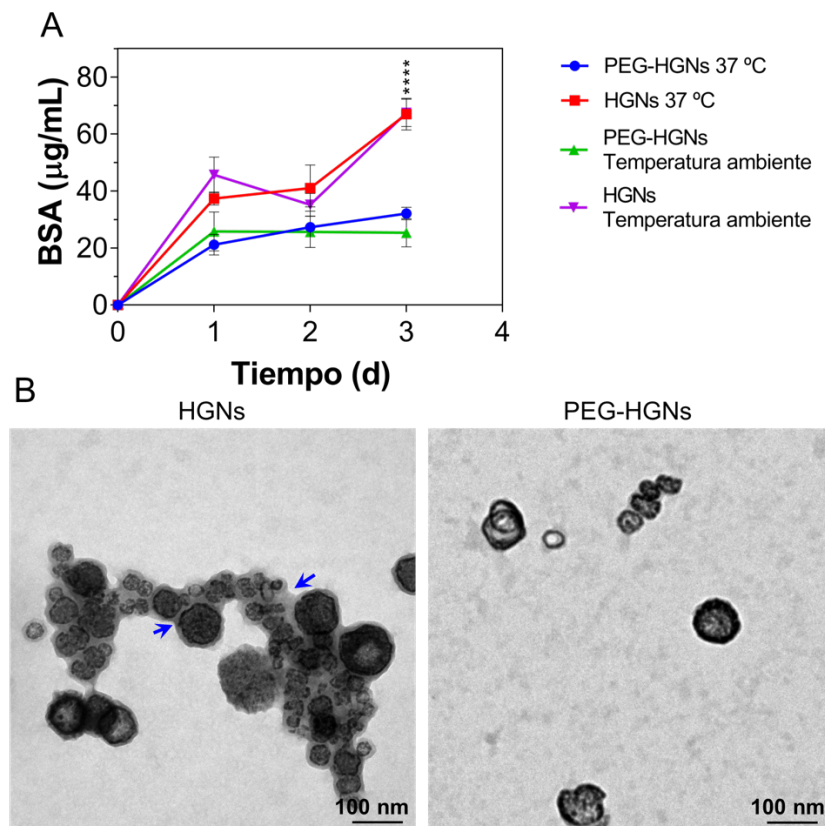


Figura 4.8. A) Cuantificación de la cantidad de corona proteica (BSA) formada alrededor de las HGNs y PEG-HGNs durante 3 días a 37 °C y a temperatura ambiente. B) Fotografías de TEM de las partículas incubadas en medio de cultivo a 37 °C durante 24 horas para observar la influencia del PEG sobre su estado de agregación.

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

Por otro lado, también se estudió el estado de agregación de las partículas por TEM. En la **Figura 4.8.B** se recogen imágenes de las partículas en presencia (derecha) y ausencia (izquierda) de PEG tras su incubación en DMEM + 10 % de FBS durante 24 h. Estas imágenes corroboran los datos obtenidos por el ensayo de BCA y muestran un estado de agregación de las partículas significativamente mayor en ausencia de PEG. Además, puede observarse que dichos agregados de HGNs están rodeados por una corona de materia orgánica (atribuida a material proteico presente en el medio de cultivo señalada con flechas azules) comparado con las PEG-HGNs, las cuales se muestran aparentemente monodispersas y sin estar rodeadas de la corona proteica. Finalmente, para confirmar dicha hipótesis se realizaron medidas de la carga superficial de ambos tipos de NPs tras haber sido incubadas en medio de cultivo durante 24 h (**tabla 4.1**). Dichos valores de potencial zeta fueron $-3,64 \pm 2,73$ mV y $-8,50 \pm 1,50$ mV para las HGNs y las PEG-HGNs, respectivamente. Por tanto, la ausencia de la corona de PEG favorece la adsorción de proteínas en la superficie de las NPs, contribuyendo a neutralizar la carga superficial de las NPs en dispersión, y por tanto favoreciendo su aglomeración.

Tabla 4.1. Determinación de la carga superficial de las partículas desnudas y funcionalizadas recién sintetizadas y tras 24 horas de incubación en medio de cultivo complementado con 10 % de FBS.

	Día 0	Tras 24 h en DMEM + 10 % FBS
HGNs	$-15,35 \pm 0,84$ mV	$-3,64 \pm 2,73$ mV
PEG-HGNs	$-10,48 \pm 0,35$ mV	$-8,50 \pm 1,50$ mV

4.2.2.3. Caracterización de exosomas derivados de células B16-F10

Las fotografías de TEM de los Exos^{B16-F10} aislados por ultracentrifugación (**figura 4.9**) así como el histograma de dispersión de tamaños obtenido a partir de las mismas (**figura 4.10.A**), muestran partículas esféricas de $95,1 \pm 27,8$ nm similares a los mostrados en otras publicaciones.¹⁶¹

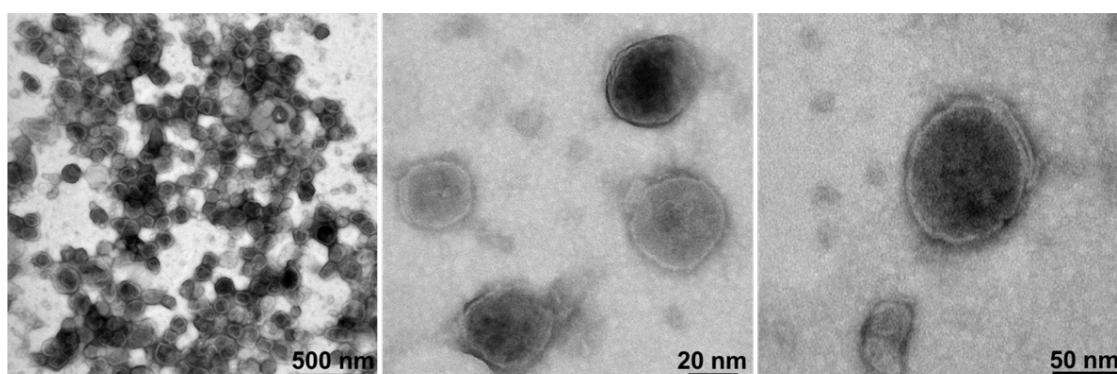


Figura 4.9. Fotografías de TEM de exosomas derivados de células B16-F10.

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

En las imágenes de microscopía electrónica es posible observar la doble bicapa lipídica de unos de 10 nm de grosor, característica de este tipo de vesículas extracelulares.^{161,162} El análisis de potencial zeta reveló una carga superficial de $-18,56 \pm 1,9$ mV a pH 7. Esta carga negativa se atribuye a la naturaleza fosfolipídica de la doble membrana que rodea al exosoma.¹⁶³

El diámetro de estos Exos^{B16-F10} se evaluó también independientemente por DLS (108,47 \pm 24,90 nm), así como por NTA (159,7 \pm 54,4 nm). Ambos ligeramente superiores a los valores obtenidos por las fotografías de TEM ya que técnicas como el DLS o el NTA proporcionan valores sobre el diámetro hidrodinámico (correspondiente a la suma del diámetro del exosoma junto con una capa eléctrica dipolar adherida a su superficie). La **figura 4.10.B y figura 4.10.C** recoge los histogramas de tamaño de los exosomas derivados de células B16-F10 obtenidos por DLS y NTA, respetivamente.

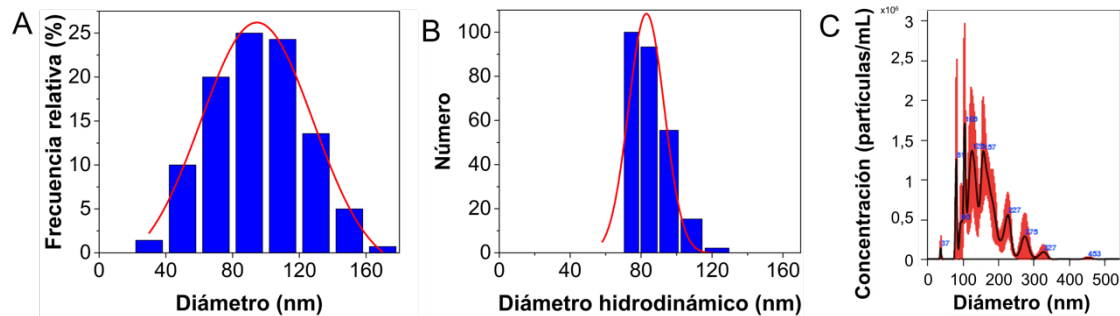


Figura 4.10. Histogramas de dispersión de tamaños obtenidos para los exosomas derivados de células B16-F10 obtenidos por A) TEM y B) DLS. C) Resultados de NTA.

La expresión de varias proteínas exosomales se estudió mediante WB (**figura 4.11**), encontrándose la presencia de CD9 (proteína de la familia de la tetraspaninas) y de TSG101 en los mismos. Además, como control se evaluó la expresión de un gen *housekeeping* (α -Actina) y la ausencia de calnexina (proteína no expresada en estas vesículas extracelulares). Los resultados de TEM, potencial zeta, NTA y WB demuestran que estas vesículas se corresponden con exosomas y no con otro tipo de vesículas extracelulares de naturaleza diferente.¹⁶⁴

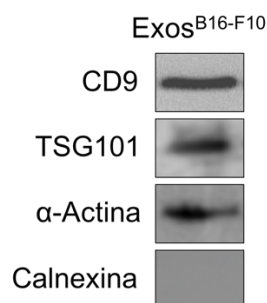


Figura 4.11. Resultados de WB para evaluar la expresión de las proteínas CD9, TSG101, α -Actina y calnexina en los exosomas purificados.

4.2.2.4. Eficacia de la encapsulación por métodos de carga forzada

Los complejos de exosomas y HGNs obtenidos con las diferentes estrategias de encapsulación se visualizaron por TEM. Es importante señalar que el análisis por microscopía electrónica no permite cuantificar la eficacia de la encapsulación (porcentaje de exosomas cargados con al menos una partícula). Sin embargo, esta eficacia de encapsulación pudo estimarse de forma semicuantitativa a partir de un análisis estadístico de las imágenes de microscopía electrónica mostrados en la **figura 4.12**.

Es bien conocido el papel de la saponina como detergente capaz de abrir poros en las membranas.^{154,165} De hecho, la eficacia de encapsulación aumentó de $13,7 \pm 9,9$ % a $16,4 \pm 5,1$ % en presencia de saponina comparado con la incubación pasiva de las HGNs con los exosomas a temperatura ambiente. La **figura 4.12** claramente muestra que ni la incubación de las NPs con los exosomas a temperatura ambiente durante 18 h ni el uso de la saponina como agente permeabilizador afecta a la morfología de los exosomas. Sin embargo, el aumento de la eficacia de encapsulación sigue siendo limitado, y teniendo en cuenta su función como agente hemolítico, el uso de este permeabilizador se limita a ensayos *in vitro*.¹⁶⁶

Los choques térmicos I y II produjeron eficacias de encapsulación de $18,20 \pm 1,35$ % y $9,11 \pm 2$ % respectivamente. Las diferencias obtenidas entre estas dos estrategias se atribuyen a las temperaturas alcanzadas en ambos procesos y consecuentemente, a los poros generados. Mientras que congelar la dispersión de partículas y exosomas hasta -80 °C (choque térmico I) podría dañar permanentemente la integridad de la membrana exosomal, es de esperar que el abordaje de choque térmico II produzca poros más pequeños y transitorios. Haney y cols., ya usaron procesos de choque térmico para encapsular catalasa en exosomas.¹⁰⁵ No obstante, tanto el tamaño como el tipo de compuesto de interés (molécula, fármaco, nanopartícula, etc.) son cruciales para su incorporación en el interior de estas vesículas. En este caso, la **figura 4.12** claramente muestra que el empleo de choques térmicos para encapsular HGNs no sólo conduce a bajas eficacias de encapsulación, sino que, además, el tratamiento claramente afecta a la morfología de los exosomas, así como a su estado de agregación. Sin embargo, es posible observar que cuando se aplicó el tratamiento a modo de control en ausencia de partículas (únicamente a exosomas), la morfología de los exosomas no se vio afectada. Esto sugiere que el daño en los exosomas es atribuible a la enorme deformación que deben sufrir sus membranas para envolver las HGNs en su interior. En trabajos anteriores también se ha encontrado que los ciclos de congelación y descongelación aplicados a exosomas en presencia de

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

ciertas moléculas y fármacos pueden inducir su ruptura, así como favorecer su agregación.¹⁰⁵

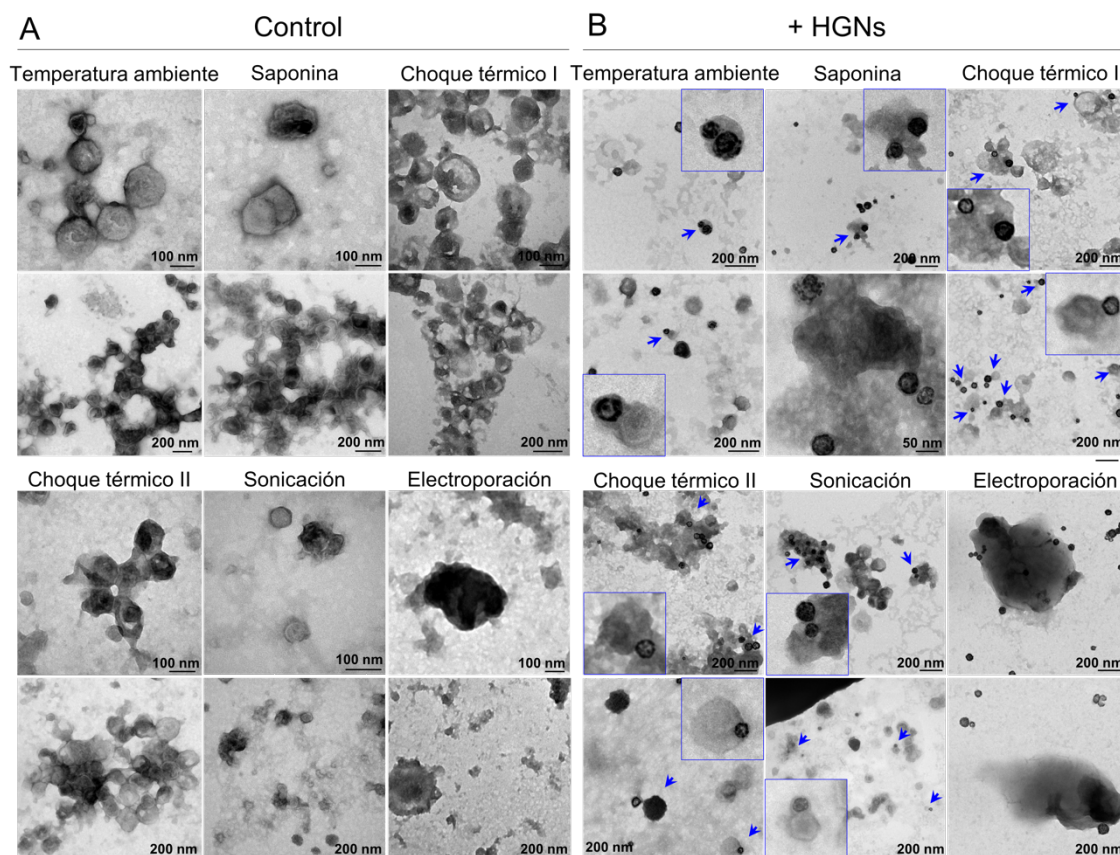


Figura 4.12. Fotografías de TEM de exosomas derivados de células B16-F10 sometidos a los tratamientos de encapsulación forzada (difusión pasiva, incubación asistida por saponina, dos estrategias de choque térmico, sonicación y electroporación) en A) ausencia o B) presencia de HGNs.

En el caso de la sonicación, de manera similar a lo que ocurre con células, Kim y cols., revelaron que la viscosidad de la membrana de los exosomas disminuye tras haberlos sometido a ultrasonidos, generando interrupciones en la misma.¹⁶⁷ Aquí se han empleado ultrasonidos para crear poros o agujeros en la bicapa lipídica de los exosomas, a fin de promover la incorporación de las HGNs al interior de los mismos. Los resultados indican que, aplicando pulsos de sonicación de baja intensidad se incrementó la eficacia de encapsulación ($19,34 \pm 10\%$) respecto al obtenido con los métodos probados anteriormente. Además, el efecto de los ultrasonidos en la integridad y morfologías de los exosomas fue mínimo (**figura 4.12**). Estos resultados sugieren que cuando los exosomas son sometidos a ciclos suaves de sonicación, su membrana sufre una remodelación que puede englobar a las partículas de los alrededores, generando un mayor número de eventos de encapsulación.¹⁶⁸ Sin embargo, las imágenes obtenidas por TEM, revelaron que algunas de las NPs estaban adheridas a la superficie

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

del exosoma y no encapsuladas en su interior. Esto concuerda con trabajos previos, que establecen que los ultrasonidos pueden promover la adhesión de fármacos a la cara externa de las membranas cuando estas se reorganizan.¹⁶⁷

El último abordaje exógeno testado para encapsular HGNs en exosomas fue la electroporación, que ha sido usada para encapsular ácidos nucleicos en exosomas. Esta técnica altera la membrana exosomal abriendo poros temporales en presencia de un campo electrónico en un medio conductivo.¹⁶⁹ Por ejemplo, Alvarez-Erviti y *co/s.*, emplearon la electroporación para introducir un siARN terapéutico de la enzima crítica beta secretasa 1 (BACE1) en exosomas derivados de células dendríticas para el tratamiento de Alzheimer.¹⁷⁰ También Ohno y *co/s.* utilizaron electroporación para cargar exosomas con un miARN terapéutico que inhibe la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Además, la superficie de los exosomas se modificó con GE11 o factor de crecimiento epidérmico (EGF) para alcanzar específicamente tejidos cancerosos que expresaran EGFR, previo a su administración intravenosa en ratones con tumores xenograft de mama.¹³⁶ Sin embargo, los resultados de esta Tesis Doctoral muestran que la electroporación causa un significativo daño exosomal y no fue posible cuantificar la eficiencia de encapsulación (los exosomas mostrados en la **figura 4.12** sufren un daño severo tras la electroporación, generándose grandes agregados de materia orgánica tanto en ausencia como en presencia de HGNs), que en todo caso fue muy baja.

En resumen, en cuanto a la eficacia de encapsulación de HGNs en exosomas derivados de células B16-F10 con los métodos testados, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre: la incubación a temperatura ambiente con y sin saponina, los choques térmicos I y II o los pulsos de sonicación. Por el contrario, la electroporación no sólo condujo a una baja eficacia de encapsulación, sino que además produjo un importante daño en su morfología induciendo la formación de grandes agregados. La **figura 4.13** recoge un resumen comparativo de los porcentajes de encapsulación de HGNs en exosomas derivados de células B16-F10 obtenidos con los diferentes métodos testados.

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

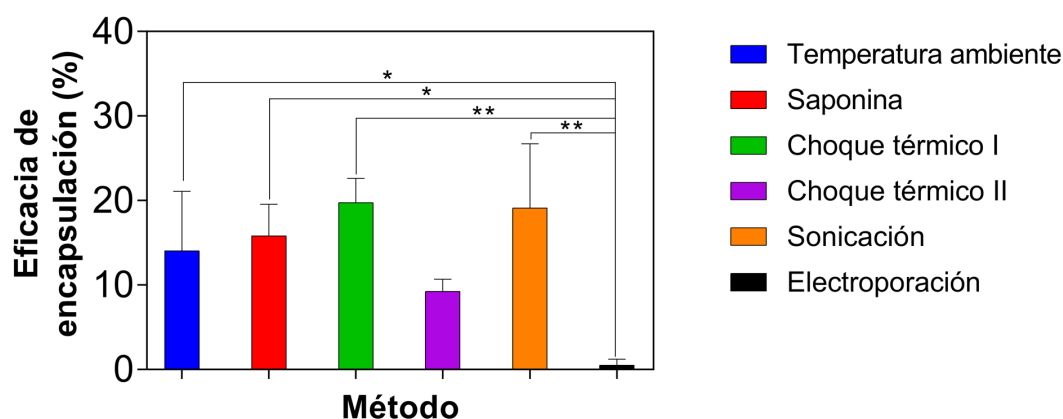


Figura 4.13 Porcentaje de encapsulación de HGNs en exosomas derivados de células B16-F10 obtenidos con los diferentes métodos exógenos fisicoquímicos testados.

4.2.2.5. Encapsulación de HGNs y PEG-HGNs mediante captación natural

Considerando las bajas eficacias de encapsulación obtenidas por los diferentes métodos de encapsulación forzada probados; y con el objetivo de maximizar dicho porcentaje de encapsulación, se decidió explorar un método alternativo en el cual, gracias a la maquinaria propia de la ruta de biogénesis de los exosomas, la incorporación de las NPs en estas vesículas ocurriría por el propio mecanismo celular (captación natural). En este método las partículas objetivo se introducen en el medio de cultivo en el que se incuban las células, por tanto, el primer paso necesariamente consiste en establecer la dosis máxima de NPs que puede utilizarse en el proceso. Con este fin, se realizaron ensayos de toxicidad metabólica con HGNs y PEG-HGNs en células B16-F10 para determinar la dosis subcitotóxica y experimentos de internalización para elegir las condiciones óptimas para la encapsulación siguiendo su propia ruta de biogénesis.

Evaluación de la citotoxicidad de las partículas

Aunque las partículas de oro se caracterizan por ser inertes y biocompatibles, se comprobó su toxicidad en la línea celular B16-F10 antes de proceder a su incubación con las células parentales. La **figura 4.14** recoge los resultados del ensayo de citotoxicidad metabólica Alamar Blue realizado sobre células B16-F10 tratadas con HGNs y PEG-HGNs a diferentes tiempos de estudio (24, 48 y 72 h). Todos los resultados se expresan en porcentaje de viabilidad comparados con un control sin tratamiento, considerado como el 100 % de viabilidad. En el caso de las HGNs en todos los tiempos de estudio se observó una disminución dosis dependiente de la viabilidad celular. Con las dosis más altas de HGNs (0,5 y 0,25 mg/mL) se obtuvo una disminución estadísticamente significativa en la viabilidad celular comparado con células sin tratar. Estos resultados contrastan con los obtenidos para las PEG-HGNs (donde la viabilidad

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

de las células no se vio significativamente afectada). Solo se observó una disminución de viabilidad significativa a las 48 h de incubación para las dos dosis más altas.

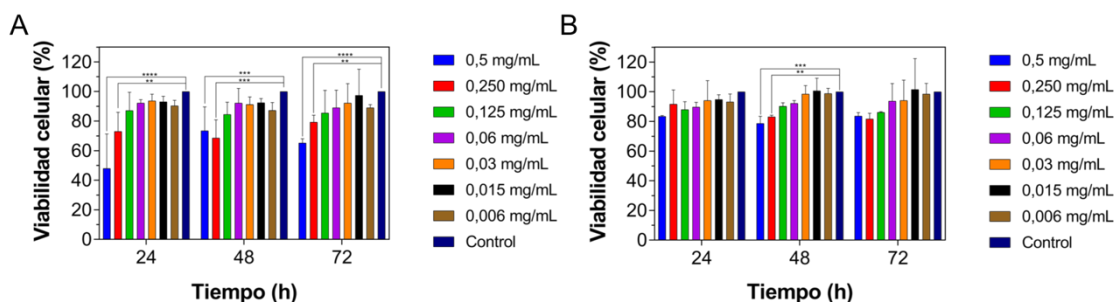


Figura 4.14. Citotoxicidad de A) HGNs y B) PEG-HGNs en células B16-F10. Las gráficas muestran la viabilidad celular después de la incubación durante 24, 48 y 72 h con diferentes concentraciones de partículas desnudas y funcionalizadas con PEG.

Estos datos concuerdan con resultados previamente descritos, los cuales establecen que la funcionalización de nanomateriales con PEG contribuye notablemente a reducir su toxicidad y aumentar su estabilidad en medios biológicos.¹⁷¹ Además, éstos también son coherentes con los obtenidos por nuestro grupo de investigación en otras líneas celulares tales como HeLa, mMSCs o fibroblastos.¹⁵⁶ Conforme marca la norma UNE-EN ISO 10993-5:2009 (Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 5: Ensayos de citotoxicidad in vitro), una reducción en la viabilidad celular mayor del 30 % comparado con células control se considera efecto citotóxico. Consecuentemente, 0,125 mg/mL fue elegida como la dosis subcitotóxica de HGNs y PEG-HGNs para realizar los experimentos posteriores.

Internalización de PEG-HGNs en células B16-F10: Microscopía confocal y MP-AES

Tras poner en contacto las dispersiones de partículas HGNs y PEG-HGNs con células B16-F10 durante 24, 48 y 72 h, se recogieron los precipitados celulares y los sobrenadantes de dichos cultivos con el fin de cuantificar por MP-AES la cantidad de oro presente en ambas fracciones. Además, conociendo la cantidad de oro puesta en contacto con las células inicialmente (tanto de HGNs como de PEG-HGNs) se realizó un balance de materia, indicado en la **figura 4.15.A**. Estos resultados muestran que de los 91,5 μ g de oro (provenientes de las HGNs) puestos en contacto inicialmente con las células (6 mL de medio de cultivo complementado con 0,125 mg/mL de partículas), únicamente el 1,4; 2,2 y 3,2 % de las mismas fueron internalizadas por las células tras 24, 48 y 72 h de incubación, respectivamente. En el caso de las PEG-HGNs, de la cantidad de oro añadida inicialmente (65 μ g tras descontar la contribución de funcionalización orgánica obtenida a partir de análisis TGA) en los precipitados celulares

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

se encontró un 59,9; 63,5 y 81 % de la carga inicial tras 24, 48 y 72 h de incubación, respectivamente.

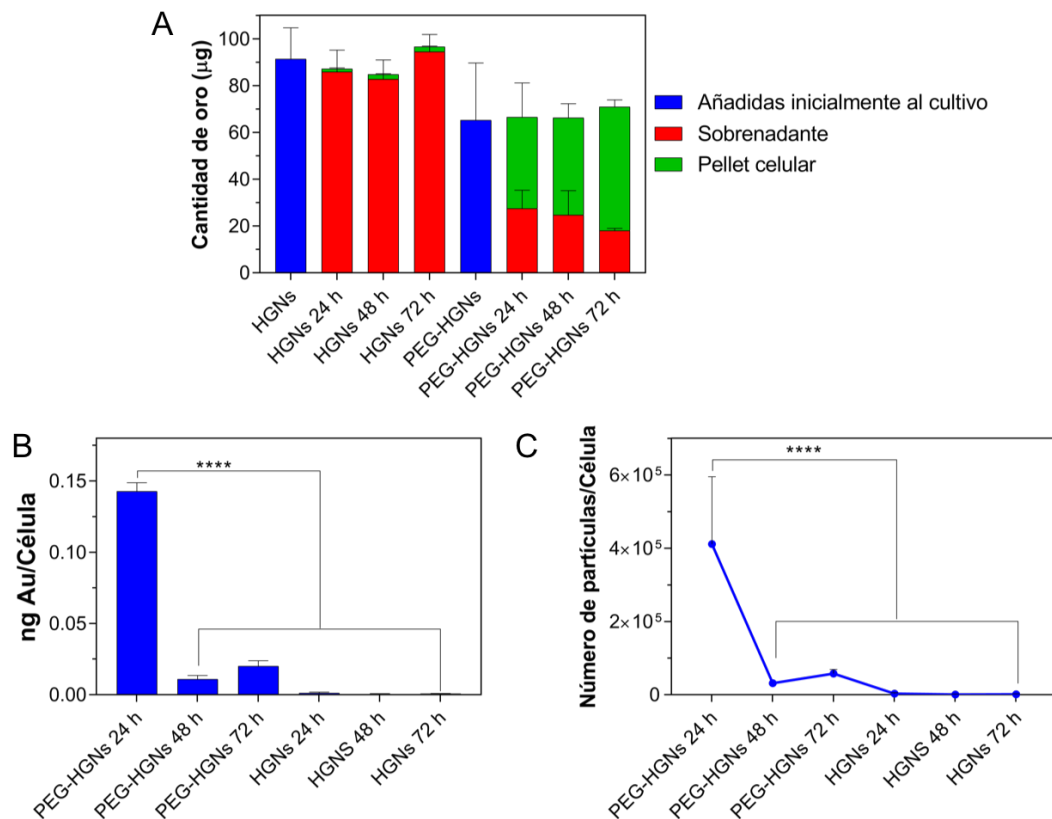


Figura 4.15. Estudio de internalización de HGNs y PEG-HGNs en células B16-F10 por MP-AES. A) Balance de materia de la cantidad de oro en los precipitados y sobrenadantes celulares. B) Cantidad de oro presente en cada célula individual. C) Cantidad de NPs internalizadas en cada célula individual.

Conociendo la cantidad de oro presente en los precipitados celulares analizados tras 24, 48 y 72 h de incubación con HGNs y PEG-HGNs; y cuantificando la cantidad de células presentes en los mismos, se realizó una estimación de los ng de oro presentes en cada célula B16-F10 individual para los diferentes tiempos de estudio. La **figura 4.15.B** y la **figura 4.15.C** indican que, incubando las partículas con las células durante 24 h se alcanzaba la máxima internalización (una media de 0,14 ng de Au por cada célula se obtuvieron al incubar las PEG-HGNs durante este tiempo). Esto significa que cada célula B16-F10 contenía aproximadamente 700000 PEG-HGNs en su interior (correspondientes con 0,14 ng de oro). En el caso de las partículas desnudas, también se obtuvo una internalización celular máxima a las 24 h de incubación (comparado con 48 y 72 h). Si bien, la cantidad de HGNs internalizadas fue significativamente menor que cuando estas eran recubiertas con PEG (cada célula individual contenía 1,2 pg de oro, correspondiéndose con aproximadamente 6000 partículas HGNs). El aumento en la

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

internalización celular de los nanomateriales funcionalizados con PEG (comparado con sus homólogos desnudos), se ha atribuido a una mayor estabilidad hidrodinámica de las partículas y a un menor grado de aglomeración asociado al recubrimiento con PEG.^{172,173,174}

Finalmente, se estudió el tráfico intracelular de las partículas por microscopía confocal. Tal y como se ha descrito anteriormente, las fibras de actina del citoesqueleto se marcaron con faloidina (en este caso, conjugada a Alexa-488). La tinción de los núcleos se realizó con DRAQ5 y los aglomerados de partículas se observaron directamente por reflexión. Las proyecciones ortogonales realizadas a partir de las adquisiciones en dirección Z (**figura 4.16**), muestran la distribución de ambos tipos de NPs en el citoplasma celular tras 24 h de incubación. Tal y como se esperaba, considerando el tamaño de las partículas comparado con el de los poros nucleares (aproximadamente 9 nm), éstas no se observaron en los núcleos de las células.¹⁷⁵

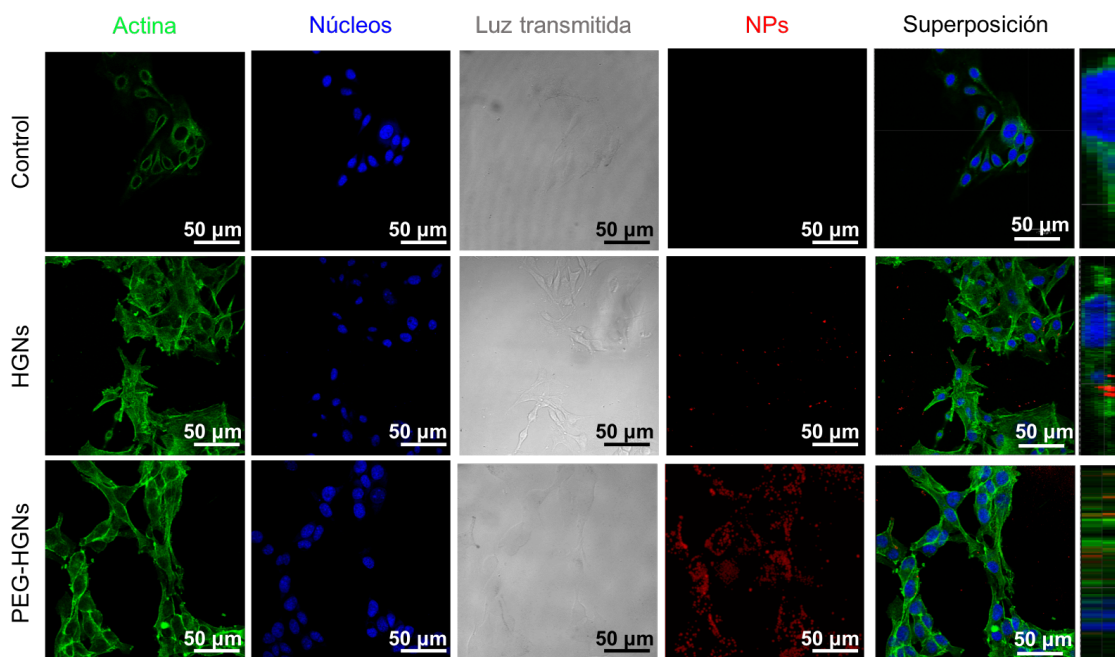


Figura 4.16. Estudio de internalización de HGNs y PEG-HGNs en células B16-F10 por microscopía confocal. Los puntos rojos se corresponden con agregados de partículas en el interior celular.

Caracterización de los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} tras su incubación con células parentales

Considerando los datos proporcionados por el ensayo de citotoxicidad y por el análisis de internalización celular, las células B16-F10 se incubaron durante 24 h con las PEG-HGNs para posteriormente purificar sus exosomas siguiendo el protocolo de ultracentrifugación detallado anteriormente.

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

El estudio de microscopía electrónica muestra la presencia de las partículas en el interior de los exosomas tras su purificación (PEG-HGNs-Exos^{B16-F10}), indicando que una gran proporción de estas vesículas extracelulares secretadas por sus células parentales estaban cargadas con partículas, y a menudo los exosomas portaban más de una nanopartícula en su interior (**figura 4.17**). El porcentaje de exosomas eficazmente cargados con las partículas se estimó de forma semicuantitativa a partir de las imágenes tomadas por TEM.

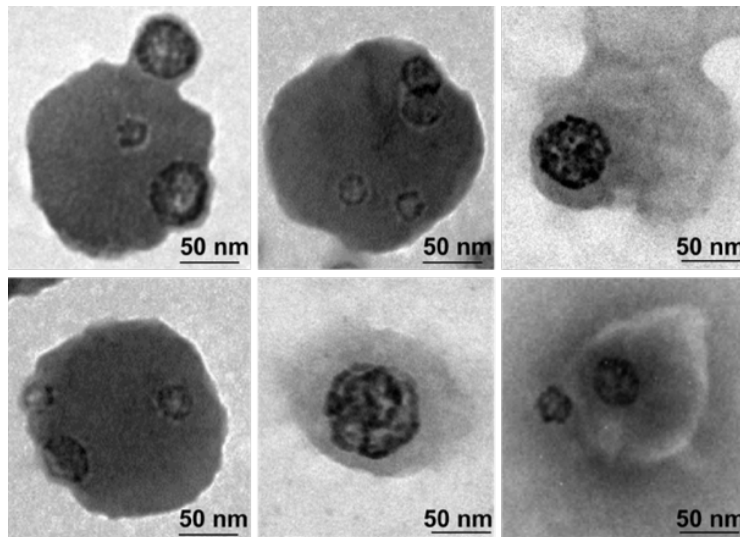


Figura 4.17. Fotografías de TEM de PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} obtenidos de células previamente incubadas con las partículas durante 24 horas.

El análisis estadístico de todas las estrategias testadas (encapsulación forzada y captación natural) mostrado en la **figura 4.18** indica que el 49,11 % de los exosomas secretados por las células estaban cargados PEG-HGNs, un incremento muy considerable comparado con las estrategias fisicoquímicas de encapsulación forzada testadas anteriormente.

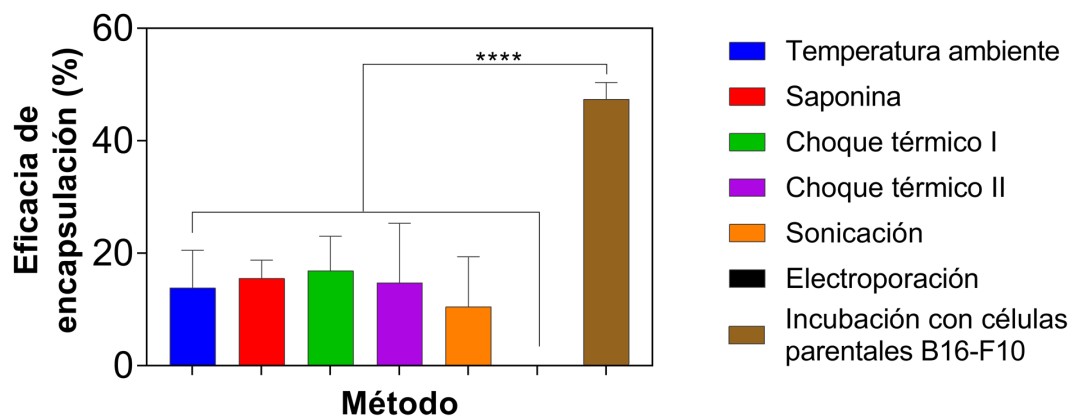


Figura 4.18. Eficacias de encapsulación de partículas en exosomas derivados de células B16-F10 obtenidos por los métodos directos (estrategias de incubación pasiva y activa) y por un abordaje indirecto (incubación de las partículas con las células secretoras).

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

Para confirmar que las partículas estaban realmente dentro de los exosomas y no adheridas a su superficie, se realizó un ensayo de co-localización. Las imágenes de microscopía confocal (**figura 4.19.A**) revelaron que al poner en contacto exosomas de células control (sin tratamiento) con PEG-HGNs en una disolución de PBS y someterlas a observación inmediata bajo el microscopio confocal, se apreciaron segregadamente señales rojas (proporcionadas por la reflexión emitida por las partículas) y puntos de fluorescencia verde (correspondientes con los exosomas marcados con la sonda PKH67). Por otro lado, en la muestra correspondiente a los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10}, se observaron píxeles amarillo-anaranjados, causados por la emisión simultánea de señal roja de las PEG-HGNs y de señal verde de los exosomas en el mismo píxel, demostrándose así co-localización y, por tanto, la presencia de las NPs en el interior de los exosomas. Las imágenes de microscopía de alta resolución en 3D adquiridas en el modo Airy Scan del microscopio confocal LSM 880, de nuevo revelaron la presencia de píxeles amarillo-anaranjados, reflejando la presencia de las NPs en el interior de los exosomas (**figura 4.19.B**).

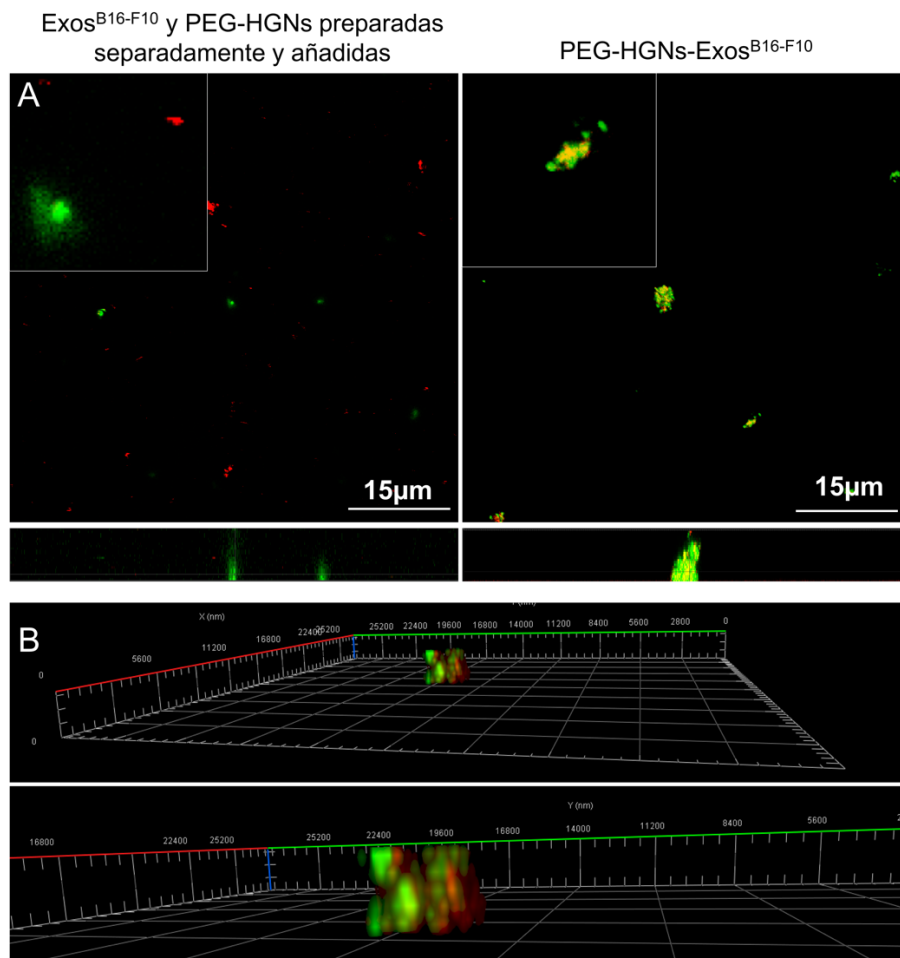


Figura 4.19. Seguimiento de la co-localización de PEG-HGNs con exosomas por microscopía confocal. Los píxeles amarillos demuestran la presencia de las partículas en el interior de los exosomas. B) Imagen de alta resolución en 3D de los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10}.

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

El análisis de potencial zeta de los Exos^{B16-F10} y de los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} aislados muestra que la presencia de las partículas en el interior de las vesículas no afectaba a la carga superficial de los exosomas ($-18,56 \pm 1,93$ mV vs $-19,50 \pm 1,2$ mV). Beltzer y cols., mostraron que la carga superficial de los exosomas disminuía significativamente al producirse la adherencia de AuNPs en su superficie.¹⁴² En nuestro caso, la constancia en la carga superficial de los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} es otra indicación de que las HGNs se encuentran preferentemente en el interior de las vesículas y no adheridas a su superficie. El análisis de WB realizado a Exos^{B16-F10} y a PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} purificados a partir del mismo número de células, corrobora la naturaleza exosomal de estas vesículas, pues ambas muestran expresión de CD9 (figura 4.20.A). Es interesante notar que, para el mismo número de células secretoras de exosomas, los niveles de expresión de CD9 eran claramente superiores en presencia de partículas, sugiriendo que la presencia de PEG-HGNs podría estimular la biogénesis y secreción de estas vesículas extracelulares. De forma similar, la expresión de la α -actina (proteína control) también era más alta en los exosomas secretados por las células B16-F10 en presencia de PEG-HGNs.

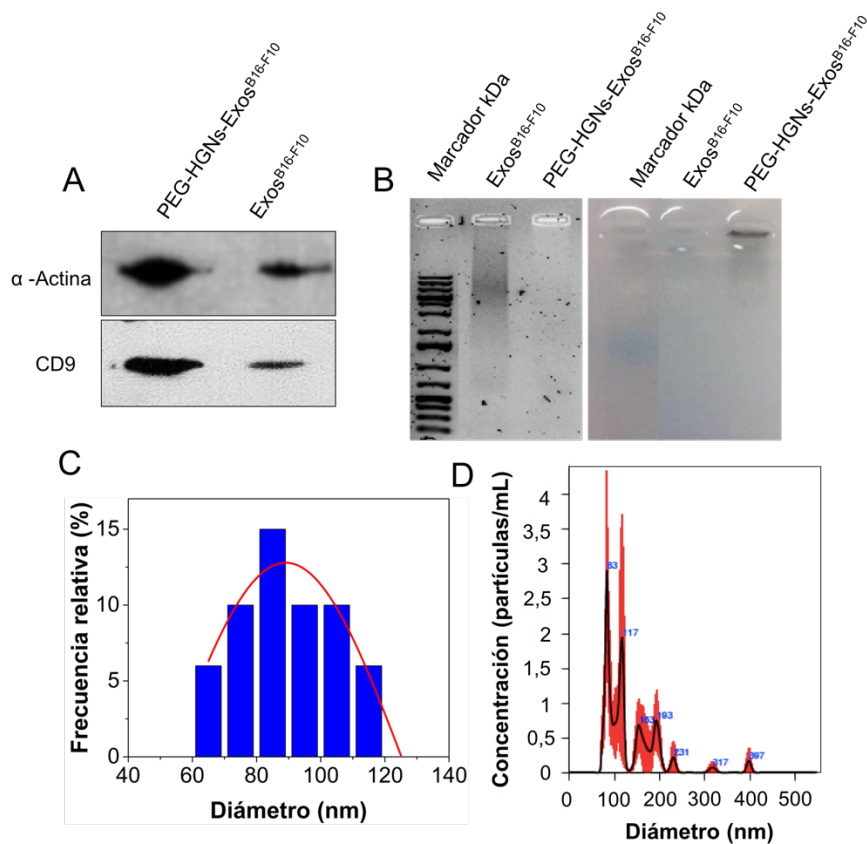


Figura 4.20. Caracterización de los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10}. A) Expresión de α -actina y CD9 por WB. B) Ensayo de retardo en gel. C) Distribución de tamaños de los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} obtenida a partir de observaciones de TEM. D) Distribución de tamaños de los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} obtenida a partir de NTA.

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

Se analizó la velocidad de migración de los exosomas con y sin partículas en un gel de agarosa sometido a electroforesis (**figura 4.20.B**). Se observó que en ausencia de partículas, aparecía una banda de fluorescencia a lo largo del carril, atribuida a material genético presente en la superficie de estas vesículas (es bien conocido que los exosomas contienen dsADN de gran tamaño ($> 2,5$ Kpb) en su superficie).¹⁵⁷ Contrariamente, aunque no se observó banda de fluorescencia de forma clara, los exosomas cargados con partículas (tonalidad azul-negra) quedaron retenidos en el pocillo. Esta falta de fluorescencia es probablemente debida al fenómeno de *quenching* provocado por la aglomeración de las partículas.¹⁷⁶ Si bien, gracias a la coloración turquesa oscura de las NPs localizadas en el interior de los exosomas, éstos se observaron claramente retenidos en el interior del pocillo del gel. Por su parte, el tamaño de los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} calculado a partir de las observaciones de TEM fue de $88,02 \pm 10,2$ nm y el obtenido a partir del NTA reveló diámetro hidrodinámico medio de $135,2 \pm 82,8$ nm (**figura 4.20.C** y **figura 4.20.D**), en ambos casos similar al obtenido para los exosomas control mostrado anteriormente. De nuevo, tal y como se esperaba, el diámetro hidrodinámico de los exosomas fue ligeramente superior al medido a partir de las imágenes de microscopía electrónica.

En un estudio reciente se internalizó DOX y PTX en exosomas derivados de células endoteliales de cerebro incubándolos a temperatura ambiente. Este estudio demostró el potencial terapéutico de dichos exosomas (aumentando la internalización de los fármacos en las células diana y demostrando su eficacia como agente anticanceroso *in vitro*). Además, gracias a la encapsulación de ambas moléculas en exosomas, dichos vectores atravesaron la barrera hematoencefálica en modelos de glioblastoma en *Danio Rerio* (*Zebrafish*), liberando exitosamente su contenido terapéutico en el cerebro y disminuyendo significativamente el crecimiento de los tumores cerebrales comparado con los fármacos desnudos.¹³⁸ Del mismo modo, también se ha conseguido la encapsulación eficiente de pequeñas AuNPs (10 nm) conjugadas a DOX en exosomas con el objetivo de vehicular el fármaco específicamente a células de cáncer de pulmón, protegiéndolo de la degradación gracias a la envoltura exosomal.¹⁷⁷ Por su parte, la combinación de exosomas con NPs de diferentes materiales ha abierto recientemente un nuevo campo con múltiples aplicaciones, aunque la mayoría de los intentos de encapsulación han utilizado métodos exógenos, obteniendo eficacias relativamente bajas (**tabla 4.2**).

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

Tabla 4.2. Resumen de los trabajos publicados combinando exosomas y NPs.

Célula parental	Tipo de NPs	Tamaño de NPs	Estrategia de encapsulación	Aplicación	Referencia
Células madre mesenquimales	Venofers	65 nm	Marcaje de células parentales	Hipertermia magnética <i>in vivo</i>	Altanerova y cols., 2017 ¹¹⁶
Células madre tejido adiposo	USPIOs	5-7 nm	Marcaje de células parentales	MRI <i>in vivo</i>	Busato y cols., 2016 ¹¹⁷
Células de melanoma murino	SPIONs	5 nm	Carga pasiva y electroporación	Marcaje	Hood y cols., 2014 ¹¹⁴
Células de melanoma murino	SPIONs	5 nm	Electroporación	MRI <i>in vivo</i>	Hu y cols., 2015 ¹²¹
Células glioma	SPIONs, curcumina y péptido dirigido a neuropilón-1	5 nm	Electroporación y química click	Terapia dirigida <i>in vivo</i> y MRI	Jia y cols., 2018 ¹²²
Células de melanoma murino	PEG-HGNs	40-45 nm	Métodos fisicoquímicos e incubación con células parentales	Hipertermia óptica e imagen <i>in vitro</i>	Sancho-Albero y cols., 2019 ¹⁷⁸
Células madre de placenta	PEG-HGNs	40-45 nm	Marcaje de células parentales	Hipertermia óptica dirigida <i>in vitro</i>	Sancho-Albero y cols., 2019 ¹⁷⁹
Células madre mesenquimales	AuNPs funcionalizadas con glucosa	5-20 nm	Carga activa (internalizadas o ancladas a la superficie)	CT imagen <i>in vivo</i>	Betzer y cols., 2017 ¹⁴²
Células PC-3 de cáncer de próstata	AuNPs	13 nm	Marcaje de células parentales	Liberación de ácidos nucleicos	Alhasan y cols., 2014 ¹¹³
Células de adenocarcinoma de mama	AuNPs con oligonucleótidos tiolados	14- 30 nm	Marcaje de células parentales	Liberación de ácidos nucleicos	Romero-Rodríguez y cols., 2017 ¹⁴³
Células HeLa	MOFs	250 nm	Método de fusión	Entrega de fármacos inteligente	Illes y cols., 2017 ¹²⁷
Células de cáncer de pulmón	PdNSs	2 nm	Generación <i>in situ</i> dentro de los exosomas	Catálisis bioortogonal dirigida	Sancho-Albero y cols., 2019 ¹⁸⁰
Exosomas de sangre	Agrupación de nanocristales coloidales de superparamagnéticos	10 nm	Incubación pasiva	Terapia anticancerosa	Qi y cols., 2016 ¹⁴⁰
Células de mamífero modificadas (péptido RVG)	AuNPs	48 nm	Extrusión	Penetración barrera hematoencefálica	Khongkorn y cols., 2018 ¹⁴¹
Células de melanoma murino	AuNPs funcionalizadas con ácido fólico	12 nm	Marcaje de células parentales	Visualización y acumulación en tumores de pulmón	Lara y cols., 2020. ¹²⁵

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

Gran parte de los estudios en la bibliografía se sirven de procesos de electroporación para cargar exosomas con SPIONs y utilizarlos como vectores de MRI.^{117,114,121,122} En lugar de encapsular las partículas, Qi y cols., crearon un vector exosomal con doble funcionalidad anclando nanocristales de magnetita superparamagnéticos en la superficie de exosomas derivados de reticulocitos usando la interacción con el receptor de transferrina. Posteriormente, llevaron a cabo la carga de DOX en los exosomas purificados, utilizándose para el tratamiento de tumores.¹⁴⁰ Las MNPs han sido el objeto de estudio más habitual, y hasta ahora únicamente tres estudios habían descrito la encapsulación de partículas de oro en exosomas. En el primero de ellos, se trataron células PC-3 con AuNPs de 13 nm conjugadas a un anti-mi21 con el objetivo de purificar sus exosomas cargados con dicho vector y observaron que, aunque parte de los exosomas contenían las partículas de oro en su interior, en muchos otros exosomas estaban ancladas a su superficie. Estos exosomas se utilizaron como agentes de transfección para inhibir selectivamente la expresión de miR-21 en células PC-3, siendo 3000 veces más efectivos que el ARN desnudo.¹¹³ Betzer y cols. se sirvieron de un mecanismo activo mediado por el transportador de glucosa GLUT-1 para marcar las células parentales (células madre mesenquimales) y purificar posteriormente sus exosomas cargados con AuNPs de 5 a 20 nm de diámetro funcionalizadas con moléculas de glucosa. Estos exosomas se administraron intranasalmente en ratones C57bl/6, acumulándose específicamente en regiones cerebrales con lesiones, sirviendo como una prometedora estrategia para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades del sistema nervioso central.¹⁴² Paralelamente, Romarodrigues y cols., funcionalizaron AuNPs con un oligonucleótido para silenciar específicamente RAB27A, una proteína crucial en la ruta de biogénesis y procesamiento de los exosomas. Estas partículas produjeron una inhibición de la secreción de exosomas en las células parentales de cáncer de mama, así como en células receptoras, demostrando el papel de los exosomas en la comunicación paracrina y el potencial de las terapias basadas en exosomas para el tratamiento y diagnóstico de cáncer. Sin embargo, únicamente alcanzaron un 5 % de encapsulación.¹⁴³ Este mismo año, Lara y cols. han publicado un método para encapsular AuNPs en exosomas derivados de células B16-F10 mediado por su funcionalización con ácido fólico. Estos complejos se visualizaron gracias a su acumulación preferente en tumores de pulmón metastásicos *in vivo*.¹²⁵

Liberación de PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} a través de la ruta de secreción exosomal

Para confirmar que los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} eran exosomas y no otro tipo de vesículas derivadas de membrana, se evaluó el papel de las rutas de biogénesis y

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

secreción en la producción de los mismos. Los resultados de la **figura 4.21** demuestran que, inhibiendo el proceso de formación y secreción de exosomas (con Manumicina A o con siRab27, respectivamente) el número de PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} secretados fue significativamente menor.

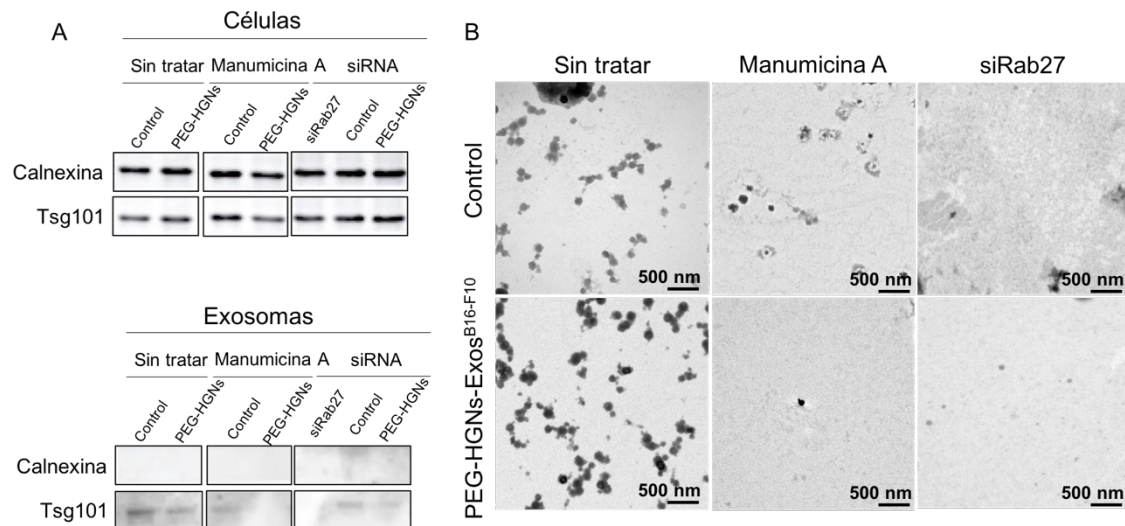


Figura 4.21. Liberación de exosomas en células tratadas con manumicina A o transfectadas con siRab27. A) WB para evaluar la expresión de las proteínas calnexina (no expresada en exosomas) y TSG101 (proteína exosomal). B) Imágenes de TEM de exosomas obtenidos en presencia o ausencia de partículas, tanto sin tratamiento como incubadas con manumicina A o siRab27.

Los resultados de WB revelan que, comparado con células control sin tratar, la expresión de la proteína TSG101 en la fracción era significativamente más baja tras el tratamiento de las células con manumicina A o con siRab27 (bloqueando la invaginación y formación de las vesículas intraluminales en los cuerpos multivesiculares o los procesos finales de la exocitosis de las vesículas, respectivamente). Las imágenes de TEM de exosomas de células control o de células tratadas con manumicina A o con siRab27, tanto en presencia como en ausencia de partículas, corroboran los resultados obtenidos por WB demostrando como la producción de PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} se ve inhibida al tratar las células con cualquiera de estos compuestos. Un análisis semicuantitativo a partir de las fotografías de TEM muestra que las células tratadas con manumicina A producían únicamente un 18,75 % y un 10,41 % de Exos^{B16-F10} y de PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} respecto al control (células sin tratar), respectivamente.

Por otro lado, las células transfectadas con el siRab27 únicamente secretaron un 6,25 % y un 4,5 % de exosomas en ausencia y en presencia de NPs, respectivamente (**tabla 4.3**).

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

Tabla 4.3. Análisis semicuantitativo a partir de las fotografías de TEM del porcentaje de exosomas producidos por células B16-10 sin tratar o incubadas con Manumicina A o siRab27.

	Sin tratar	Manumicina A	siRab27
Exos^{B16-F10}	100%	18,75 %	6,25 %
PEG-HGNs-Exos^{B16-F10}	100 %	10,41 %	4,5 %

Estabilidad de los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10}

La **tabla 4.4** recoge el tamaño (obtenido a partir de imágenes de TEM) y el potencial zeta de los exosomas cargados con las PEG-HGNs por el método de incubación de las células parentales. Considerando los pequeños cambios sufridos tanto en el tamaño como en el potencial zeta de los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} a lo largo de 2 semanas de almacenamiento, se puede concluir que estos son estables a -20 °C durante 7 a 14 días.

Tabla 4.4. Estudio de la estabilidad de los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10}.

Tiempo de Conservación (días)	Tamaño a partir de imágenes de TEM (nm)	Potencial zeta (mV)
0	89,7 ± 14,9	-19,50 ± 1,2
7	81,6 ± 9,8	-19,68 ± 4,1
14	75,4 ± 6,5	-15,86 ± 3,5

4.2.3. Conclusiones de esta sección

Las estrategias de encapsulación forzada (difusión pasiva de las NPs, con o sin saponina como agente permeabilizador, dos estrategias de choque térmico y sonicación) proporcionaron eficacias de encapsulación de hasta un 20 %. En cambio, el uso de pulsos de electroporación causó daños irreversibles en la integridad y morfología de los exosomas, tanto en presencia como en ausencia de partículas. Por otro lado, mejores resultados se obtuvieron con la vía de captación y encapsulación natural. En este caso, aunque tanto las partículas desnudas como funcionalizadas con PEG pueden ser empleadas *in vitro* a dosis subcitotóxicas, se observó como la funcionalización de las NPs con PEG 1) disminuye la citotoxicidad de las mismas en células B16-F10, y 2) aumenta significativamente la estabilidad de las mismas en medio de cultivo, favoreciendo su internalización en células diana, en particular pasadas 24 h de incubación. Por su parte, en los exosomas secretados por las células parentales el porcentaje de encapsulación aumentó hasta el 50 %. Además, se pudo confirmar que los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} procedían de la ruta de biogénesis y secreción exosomal, y

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

que conservaban el tamaño, la morfología, la carga superficial y la expresión de proteínas específicas.

4.3. Encapsulación de HGNs y PEG-HGNs en Exos^{hpMSCs}: vectores específicos con selectividad celular

Una vez optimizado el método de encapsulación de las HGNs en el interior de exosomas derivados de células B16-F10; y siendo la incubación de las partículas recubiertas con PEG con células parentales el método significativamente más eficaz, se procedió a optimizar la encapsulación de dichas partículas en exosomas derivados de hpMSCs. Dichos exosomas se plantean como vectores para transportar las partículas teragnósticas a los tumores *in vivo*.

4.3.1.Experimental

En este apartado únicamente se detallarán los materiales y métodos no descritos anteriormente. En particular, el manejo y el mantenimiento en cultivo de las hpMSCs, así como el proceso de purificación de los exosomas, y las técnicas empleadas en la caracterización de los mismos se encuentran en el capítulo 3. Los ensayos de citotoxicidad y de internalización celular se realizaron de manera similar a los llevados a cabo con las células B16-F10.

4.3.1.1. Ensayos de toxicidad, ciclo celular e internalización celular

Los estudios se han realizado en condiciones análogas a los desarrollados con células B16-F10, salvo pequeñas diferencias que se señalarán en su momento. A continuación, se detallan las técnicas específicas empleadas en esta sección.

Identificación de la ruta de entrada de las PEG-HGNs en las células

Con el objetivo de identificar la ruta de entrada de las partículas en las hpMSCs, diversas rutas de captación se bloquearon sucesivamente haciendo uso de reactivos específicos.^{181,182,183} La endocitosis dependiente de clatrina, se bloqueó con 500 mM de sacarosa con el objetivo de atrapar la clatrina en “micro jaulas”. Para inhibir la escisión de las vesículas de clatrina de la membrana celular, las células se incubaron con HCl 0,1 mM. Para eliminar el Adenosín -5-trifosfato (ATP), las células se incubaron con 3 mg/mL de NaN.³ La interrupción de la endocitosis mediada por caveolina y la eliminación del colesterol, se realizó añadiendo ciclodextrina 5 mM a las células. Finalmente, el cultivo de las células a 4 °C durante 1 hora sirvió para inhibir la endocitosis dependiente de energía. La presencia o ausencia de las PEG-HGNs en el interior de células tratadas con los diferentes inhibidores se siguió por proyecciones ortogonales en dirección Z adquiridas por microscopía confocal. Las hpMSCs se sembraron en placas de 24

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

pocillos sobre cubreobjetos (tal y como se ha mencionado en el capítulo 3) y entonces se trataron con los diferentes inhibidores durante 1 hora. Tras ese tiempo, las HGNs y las PEG-HGNs se incubaron en dosis subcitotóxicas (0,125 mg/mL) junto con los agentes inhibidores durante 3 horas más. Por último, las células se fijaron y se marcaron los filamentos de actina y el núcleo con faloidina (conjugada a Alexa488) y DRAQ5, respectivamente, antes de ser visualizadas bajo el microscopio confocal.

Se llevaron a cabo experimentos de co-localización por microscopía confocal para estudiar la presencia de las partículas en diferentes fases de la ruta endosomal: en el interior de endosomas tempranos o tardíos. Dichos experimentos se realizaron tanto en células con la ruta endosomal dependiente de energía inhibida (incubadas a 4 °C) o en células control (cultivadas en condiciones normales de crecimiento). Las células se sembraron sobre cubreobjetos depositados sobre placas de 24 pocillos, y se añadieron las HGNs y las PEG-HGNs antes de incubar las células a 4 o 37 °C. Los endosomas tempranos y tardíos se marcaron fluorescentemente con el kit CellLight® Reagents BaMam 2.0 (Thermo Fisher) siguiendo el protocolo del fabricante. De forma resumida, tras 5 horas de la incubación de las partículas con las células a 4 o a 37°C, se eliminaron las partículas no internalizadas y se reemplazó el medio de cultivo con medio conteniendo 9 µL de la sonda suministrada por el fabricante durante 16 horas. Finalmente, las células se fijaron con PFA al 4 % y se montaron sobre portaobjetos con medio de montaje (Fluoromont-G) conteniendo DRAQ5 para marcar los núcleos.

Co-localización con CD63

La presencia de las partículas en el interior de exosomas se evaluó mediante su co-localización con la proteína CD63, de la familia de las tetraspaninas, una de las más conservadas en exosomas y clave en la génesis y secreción de estas vesículas extracelulares. Para ello, las células fueron sembradas sobre cubreobjetos e incubadas con las partículas (0,125 mg/mL) durante 24 horas (tiempo óptimo de internalización previamente establecido). Tras la fijación celular se realizó una inmunocitoquímica (ver capítulo 3) marcando los exosomas con el anticuerpo CD63-Alexa488 y los núcleos con DRAQ5. Los aglomerados de NPs se observaron directamente por reflexión de la luz incidente (ex/em 480/490 nm).

4.3.1.2. Exosomas como vectores selectivos de PEG-HGNs

Optimización de co-cultivo entre hpMSCs y monocitos THP1

Para evaluar la transferencia e intercambio de PEG-HGNs encapsuladas en exosomas entre células distintas (monocitos y hpMSCs), y compararlo con el intercambio entre células homogéneas, ambas líneas celulares se cultivaron

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

independientemente y también en co-cultivo simultáneo. En primer lugar, para optimizar el crecimiento de ambas líneas celulares en condiciones de co-cultivo, se analizaron diferentes composiciones de medio de cultivo, mezclando RPMI y DMEM con 10 % FGF utilizados para el crecimiento de THP1 y las hpMSCs, respectivamente. Finalmente se eligió un medio de cultivo conteniendo un 50 % de ambos. Una vez seleccionada la composición del medio de cultivo se marcaron los monocitos y las hpMSCs con las sondas PKH26 (ex/em 551/567 nm) y PKH67 (ex/em 490/502 nm), respectivamente, y se analizó su crecimiento en condiciones de co-cultivo por microscopía de fluorescencia.

Se evaluó la expresión de marcadores celulares de superficie específicos de monocitos y de células madre (CD19, CD14, CD34, CD45, CD73, CD90, CD10 y HLA-DR) por citometría de flujo, tanto en células co-cultivadas como en cultivos independientes. Para ello, las células incubadas en cultivos independientes fueron sembradas en placas de 6 pocillos (**tabla 3.4**) y se mantuvieron en crecimiento durante 24 horas. En el caso de los co-cultivos, se sembraron 125000 células de cada tipo. Pasadas 24 horas, se añadieron las PEG-HGNs y se incubaron durante 24 y 48 horas. Antes de analizar la expresión de los marcadores específicos por citometría de flujo, las células se tripsinizaron y lavaron con PBS dos veces (300 g, 5 minutos).

Distribución de PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en co-cultivo: microscopía *time-lapse* y MP-AES

La distribución de los PEG-HGNs-Exos derivados de monocitos y hpMSCs entre ambas líneas celulares fue visualizada en tiempo real *in vitro* (*time-lapse*) con un microscopio multidimensional Leica AF6000 LX con un objetivo de 20 x en modo luz transmitida y con cámara de cultivo acoplada, realizando capturas cada 15 minutos durante 72 horas. Como control se sembraron 100000 hpMSCs y 100000 monocitos independientemente en placas μ -Slide de 8 pocillos (IBIDI). Por otro lado, se co-cultivaron 50000 monocitos THP1 junto con la misma cantidad de hpMSCs. Se evaluó en condiciones de co-cultivo la captura y la distribución *in vitro* de las PEG-HGNs encapsuladas en exosomas de monocitos y hpMSCs cuando 1) las partículas se añadieron simultáneamente al co-cultivo durante 72 horas y 2) cuando se añadieron las hpMSCs previamente incubadas con PEG-HGNs a un cultivo con la misma cantidad de monocitos control. Las imágenes secuenciales se utilizaron para componer videos con el software Leica LAS AF (Leica Microsystems CMS GmbH). Las secuencias de imágenes, así como el seguimiento de las partículas en las diferentes secuencias fue realizado con el software ImageJ.

El intercambio selectivo de exosomas cargados con PEG-HGNs entre monocitos y hpMSCs también se determinó por MP-AES, cuantificando el Au presente en cada

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

línea celular, así como en el sobrenadante de los cultivos. Para ello, se sembraron independientemente hpMSCs y monocitos en placas de 6 pocillos. Por otro lado, se co-cultivaron monocitos con la misma cantidad de hpMSCs. Pasadas 24 horas, las PEG-HGNs se añadieron (0,125 mg/mL) e incubaron durante 24 y 48 horas adicionales con los diferentes cultivos.

En otro experimento, las partículas se preincubaron con hpMSCs durante 24 h; y posteriormente éstas hpMSCs cargadas con PEG-HGNs se pusieron en contacto con la misma cantidad de monocitos durante 24 y 48 horas más. Se realizó un experimento simétrico preincubando las partículas con los monocitos en vez de con las hpMSCs, para estudiar también la transferencia mediante exosomas derivados de monocitos. La cantidad de Au se cuantificó por MP-AES tal y como se indica anteriormente.

La captura específica de exosomas conteniendo partículas también se evaluó usando exosomas cargados con PEG-HGNs derivados de THP1 y hpMSCs previamente aislados por ultracentrifugación. Estos exosomas se añadieron a co-cultivos durante 24 y 48 h y se determinó la cantidad de oro presente en los precipitados celulares, así como en los sobrenadantes.

4.3.2. Resultados y discusión

4.3.2.1. Caracterización Exos^{hpMSCs}

Como control, se caracterizaron los exosomas secretados por las hpMSCs en ausencia de partículas. Las imágenes de microscopía electrónica (**figura 4.22**), muestran vesículas con tamaño y morfología acordes con la descrita previamente para Exos^{hpMSCs} (estructuras redondeadas de aproximadamente 100 nm de diámetro).¹⁸⁴ En algunas de las imágenes es posible apreciar la doble bicapa lipídica característica de estas vesículas. La distribución de tamaños proporciona un diámetro medio de $109,9 \pm 34,7$ nm (**figura 4.23.A**).

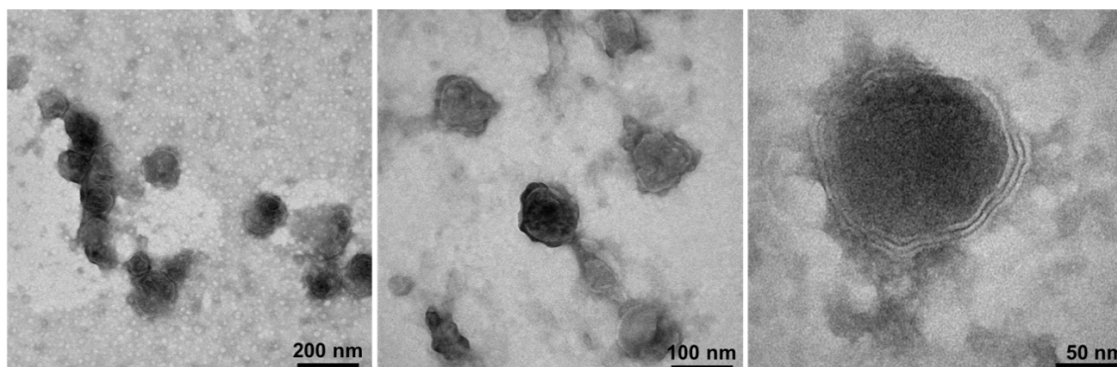


Figura 4.22. Imágenes de TEM de exosomas derivados de hpMSCs con diferente magnificación.

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

El diámetro hidrodinámico de estos exosomas fue también medido por DLS y por NTA (**figura 4.23.B** y **figura 4.23.C**, respectivamente), obteniendo un tamaño de alrededor de 170 nm. En concordancia con la bibliografía, y al igual que en los exosomas derivados de células B16-F10, el diámetro hidrodinámico fue superior al obtenido a partir de las fotografías de microscopía electrónica. Esto es de nuevo debido a que técnicas como el DLS o el NTA proporcionan valores sobre el diámetro hidrodinámico (correspondiente a la suma del diámetro del exosoma junto con una capa eléctrica dipolar adherida a su superficie).

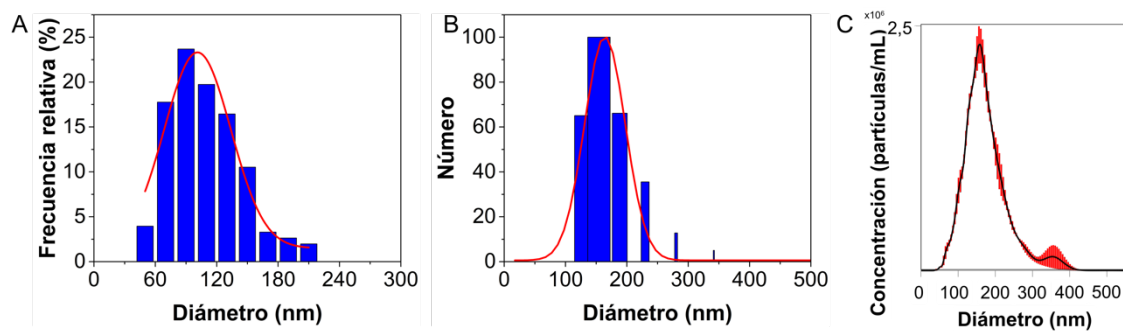


Figura 4.23. Distribución de tamaños para Exos^{hpMSCs} obtenidos por A) TEM; B) DLS; C) NTA.

4.3.2.2. Ensayos de viabilidad y de internalización celular

Evaluación de la viabilidad celular: toxicidad metabólica y ciclo celular

La biocompatibilidad de HGNs en células hpMSCs se estudió mediante Alamar Blue demostrándose que las partículas no afectan a la viabilidad celular a ninguna de las dosis y tiempos de estudio ensayados (**figura 4.24**). Por otro lado, con las PEG-HGNs se observó una disminución de la viabilidad celular estadísticamente significativa a las dosis más altas (0,5 y 0,250 mg/mL), un resultado inesperado ya que el recubrimiento con PEG suele aumentar la viabilidad. Sin embargo, la viabilidad celular a 24 h siempre estuvo por encima del 70 %, es decir, se consideran no citotóxicas de acuerdo con la norma UNE-EN ISO 10993-5:2009.

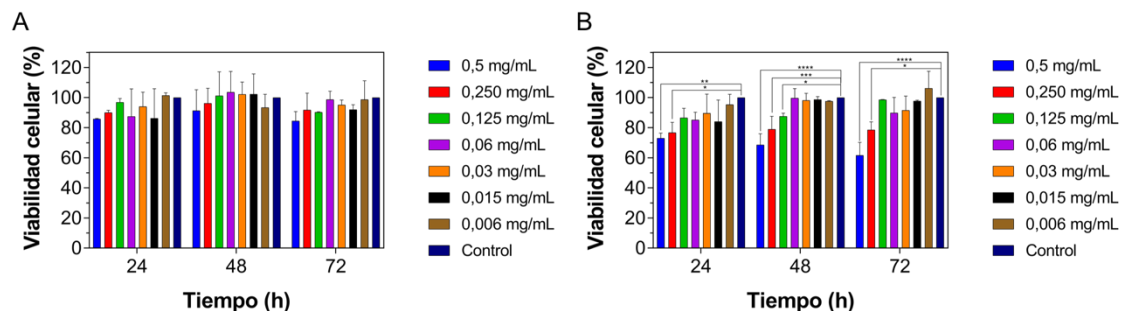


Figura 4.24. Evaluación de la citotoxicidad de las partículas en células madre mesenquimales de placenta. A) HGNs y B) PEG-HGNs.

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

A la vista de los resultados mostrados en la **figura 4.24**, se eligió de nuevo 0,125 mg/mL como dosis subcitotóxica para la realización de los experimentos de incubación con las partículas. Este aparente aumento en la toxicidad provocado por las PEG-HGNs en las hpMSCs, se atribuye a la gran cantidad de partículas internalizadas en estas células, las cuales, a pesar de no ser tóxicas, podrían provocar cambios en su metabolismo celular.

Establecida a dosis subcitotóxica, se estudió la influencia de HGNs y PEG-HGNs en el ciclo celular. En la **figura 4.25** puede observarse que las HGNs y las PEG-HGNs no producen alteraciones estadísticamente significativas en el porcentaje de células presentes en cada fase del ciclo. Sin embargo, puede observarse una ligera acumulación de células en la fase S (momento en el que se produce la síntesis del ADN) cuando son tratadas con ambos tipos de partículas. Esta alteración ha sido reportada previamente para diferentes tipos de AuNPs y puede explicarse por la acumulación de las partículas en el interior de las células.^{185,186}

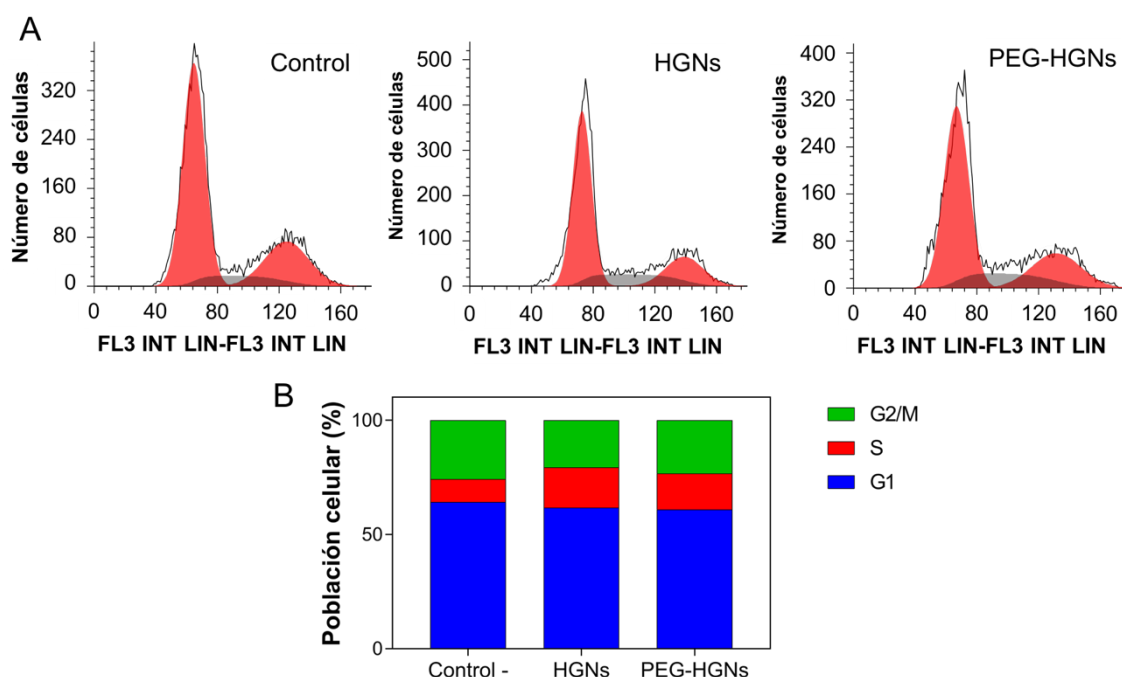


Figura 4.25. Análisis del ciclo celular de las hpMSCs control (sin tratar), con HGNs o con PEG-HGNs. A) Fases del ciclo celular. B) Análisis del porcentaje de células en cada fase del ciclo.

Internalización de PEG-HGNs en hpMSCs: microscopía confocal y MP-AES

El análisis cuantitativo por MP-AES de la cantidad de Au en las células hpMSCs se desarrolló de la misma manera que con las células metastásicas B16-F10 detallado en la sección anterior. La **figura 4.26.A** muestra como tras 24, 48 y 72 h de incubación, las hpMSCs únicamente incorporaron el 2,7; 6,8 y 6,3 %, respectivamente (de los 91,5

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

μg de oro presentes en las HGNs puestos en contacto inicialmente). Sin embargo, los porcentajes de PEG-HGNs en el precipitado de células aumentaron significativamente hasta alcanzar más de un 50 % de internalización en algunos de los tiempos estudiados (figura 4.26.A).

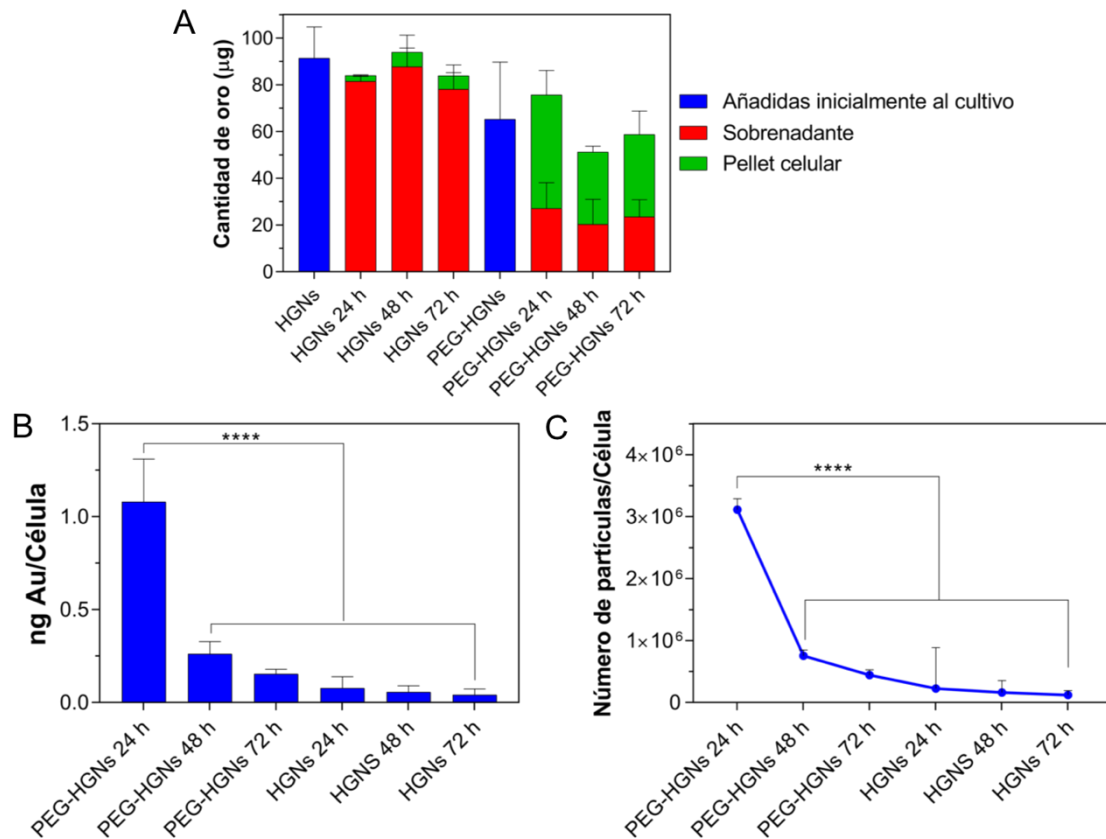


Figura 4.26. Internalización de HGNs y PEG-HGNs en hpMSCs por MP-AES. A) Balance de materia del oro en los precipitados y sobrenadantes celulares. B) Cantidad de oro presente en cada célula individual. C) Cantidad de NPs en cada célula individual.

La **figura 4.26.B** recoge la masa de partículas en el interior de cada célula individual tras diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 h), calculado a partir de la cantidad de oro en los precipitados y el número de células presentes en los mismos. Al igual que con las células B16-F10, puede observarse una cantidad de oro significativamente superior en las hpMSCs cuando se usaron PEG-HGNs (en concreto, tras 24 h cada célula era capaz de internalizar más de 1 ng de oro), lo que proporciona una estimación de más de 3 millones de PEG-HGNs por célula hpMSC. En el caso de las partículas desnudas, la internalización máxima también se alcanzó tras 24 horas de incubación, en cuyo momento cada célula hpMSCs contenía 0,08 ng de oro en su interior, unas 400000 HGNs. Estos resultados muestran como las hpMSCs son capaces de internalizar casi 10 veces más PEG-HGNs que las B16-F10 (ver **figura 4.15.C**). En

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

este punto es importante mencionar que aunque las propiedades físicas de los nanomateriales son determinantes para la internalización de las partículas, también juegan un papel importante los receptores presentes en las membranas de los diferentes tipos celulares.^{187,188} En todo caso, una vez más se demuestra que la funcionalización con PEG favorece significativamente su captura por parte de células en cultivo^{172,173,174} lo que se atribuye a una mayor estabilidad de las mismas aportada por el PEG, con un menor grado de aglomeración.

Como puede observarse en la **figura 4.27**, los resultados de microscopía confocal revelan una gran cantidad de agregados de PEG-HGNs en el citoplasma de las hpMSCs tras 24 horas de incubación, comparado con las partículas desnudas. Tal y como se esperaba, tampoco aquí aparecieron agregados en el núcleo de las células, en coherencia con el tamaño de las NPs utilizadas en relación al de los poros nucleares (de aproximadamente 9 nm).^{189,190}

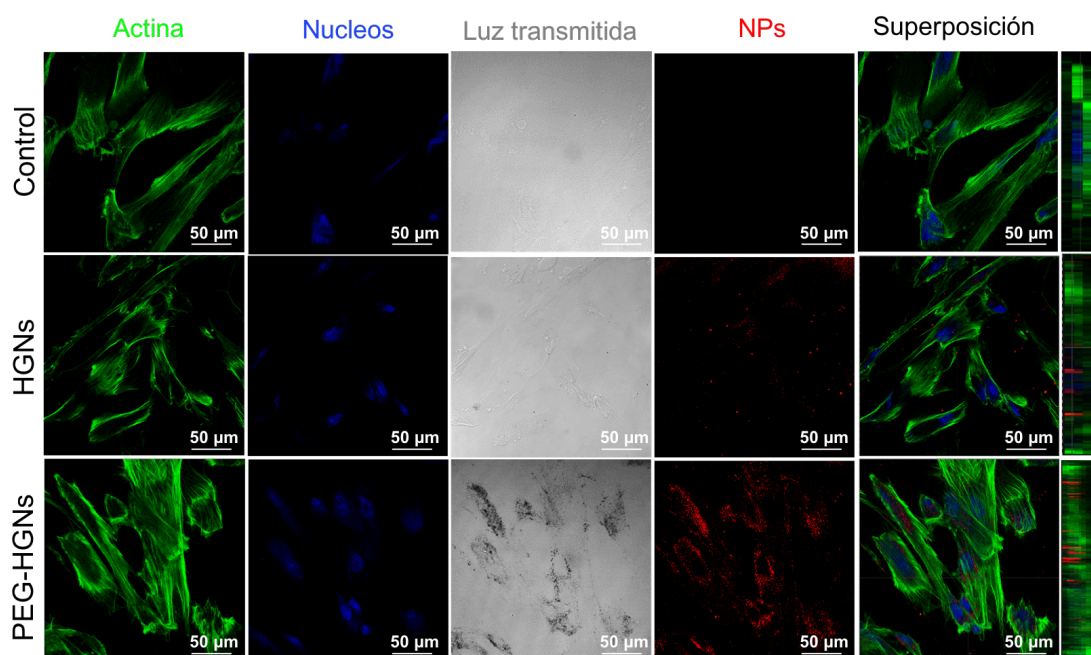


Figura 4.27. Internalización de HGNs y PEG-HGNs en células B16-F10 estudiada por microscopía confocal. Los puntos rojos se corresponden con agregados de HGNs en el interior celular.

A continuación, se presenta el estudio de las rutas de internalización seguidas por las NPs para penetrar la membrana celular y localizarse en el interior del citoplasma, como paso previo a la generación de exosomas en el interior de las células. La **figura 4.28** muestra imágenes de microscopía confocal de células tratadas con diferentes reactivos inhibitorios de rutas específicas de captación (HCl para acidificar el citoplasma celular, NaN_3 para depleccionar ATP, sacarosa para capturar clatrina en “jaulas”, β -

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

ciclodextrina para inhibir la endocitosis mediada por caveolina e incubación a 4°C para inhibir la endocitosis dependiente de energía).

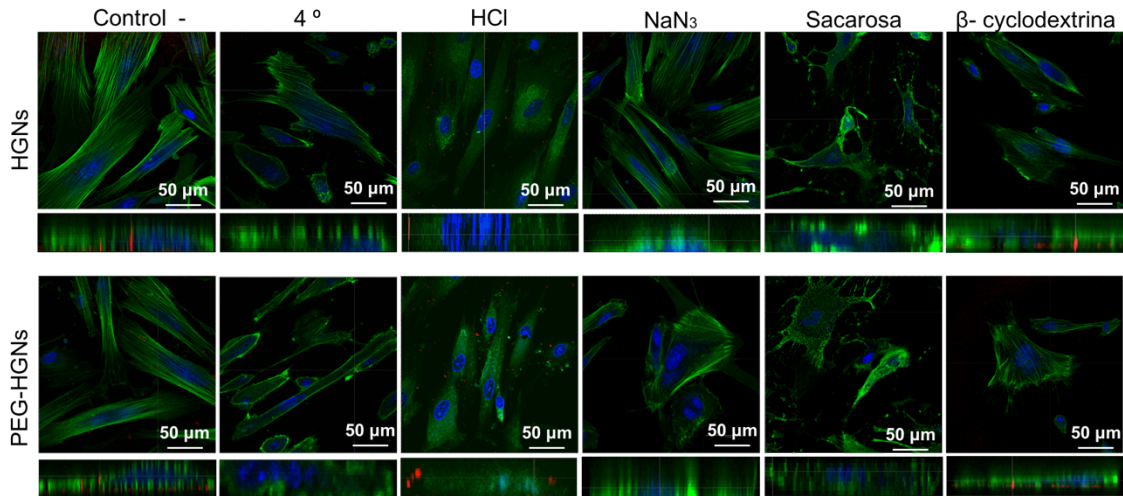


Figura 4.28. Estudio de las diferentes rutas de internalización empleadas por las HGNs y PEG-HGNs para penetrar en el citoplasma de hpMSCs.

Los resultados indican que cuando las células eran tratadas con NaN_3 e incubadas a 4°C (inhibición de endocitosis dependiente de energía), se produjo una disminución de la cantidad de partículas presentes en el citosol de las mismas (tanto HGNs como PEG-HGNs). Este mismo hecho se observó al inhibir la endocitosis dependiente de clatrina tras la adición de sacarosa al cultivo celular. Cuando las células se trataban con HCl, las partículas se localizaron en los alrededores de la membrana celular, sugiriendo que HGNs y PEG-HGNs quedaban atrapadas en vesículas recubiertas de clatrina. Por último, el tratamiento con β -ciclodextrina no afectó a la internalización, indicando que las hpMSCs incorporaban las partículas por una ruta independiente de caveolina.

Con el objetivo de profundizar en la localización de las NPs en el interior citosólico, se evaluó la presencia de HGNs y PEG-HGNs en endosomas tempranos o tardíos cuando las células se incubaron durante 5 horas con las partículas, a 4 °C o en condiciones normales de crecimiento (hipoxia, 37 °C). La **figura 4.29** demuestra como las partículas estaban localizadas en el citosol únicamente en las células incubadas en condiciones normales de crecimiento, y no en aquellas crecidas a 4°C. Tras 5 horas de incubación, las NPs se encontraban presentes en las primeras fases de la ruta de endocitosis ya que se observan píxeles amarillos, (co-localización de las partículas (en rojo), con endosomas tempranos marcados en verde). Sin embargo, tras 5 horas de incubación, no se observó co-localización de las partículas con endosomas tardíos,

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

indicando que pasado este tiempo las NPs no estaban presentes en la fase más avanzada de la ruta endosomal.

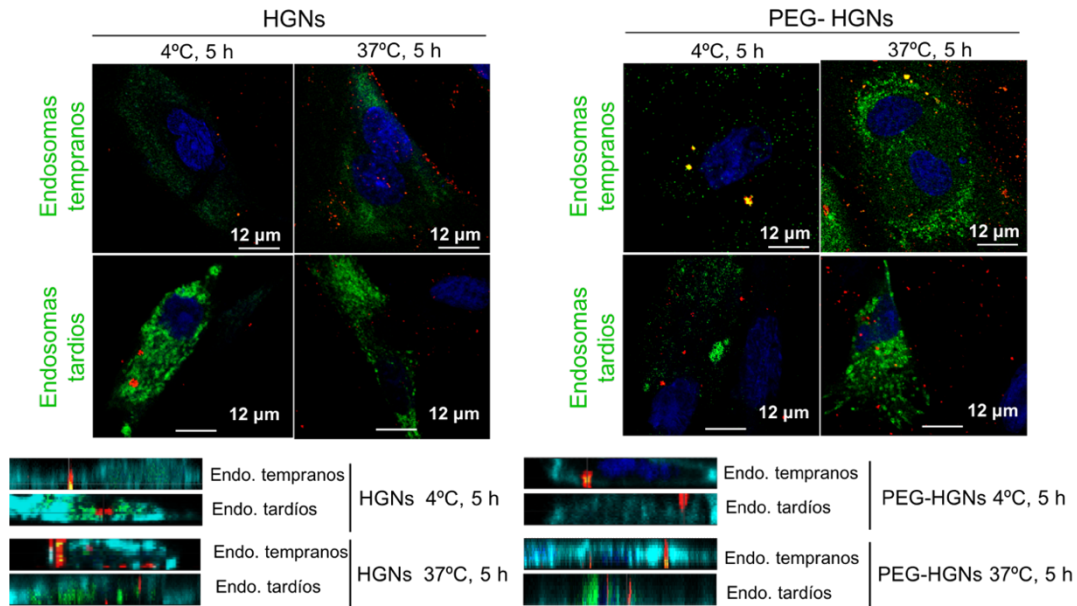


Figura 4.29. Co-localización de las HGNs y PEG-HGNs con endosomas tempranos y tardíos en hpMSCs cultivadas a 37 °C o a 4 °C.

En resumen, los resultados de microscopía confocal mostrados en las **figura 4.28** y **figura 4.29** demuestran que las principales rutas implicadas en la internalización de las HGNs y de las PEG-HGNs en el citoplasma de las hpMSCs son la endocitosis mediada por clatrina y la endocitosis dependiente de energía. Ambas rutas, necesarias en las primeras fases de la ruta de biogénesis de los exosomas.^{191,192}

4.3.2.3. Incorporación de las PEG-HGNs en Exos^{hpMSCs}

El estudio de co-localización de PEG-HGNs en el interior de vesículas positivas para CD63 se muestra en la **figura 4.30**.

Para ello, los exosomas se marcaron con un anticuerpo CD63-Alexa488 (azul), los núcleos con DRAQ5 (amarillo) y las partículas se visualizaron directamente por reflexión (rojo). La figura muestra regiones de alta co-localización de las partículas (rojo) con exosomas CD63 (azul) como píxeles morados, indicando la presencia de las HGNs y PEG-HGNs en la ruta endosomal y secretora de exosomas. Esto confirma que los MVBs y los endosomas (positivos para CD63), ambos necesarios para la secreción de exosomas, contenían las partículas en su interior antes de liberarlos al medio de cultivo.

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

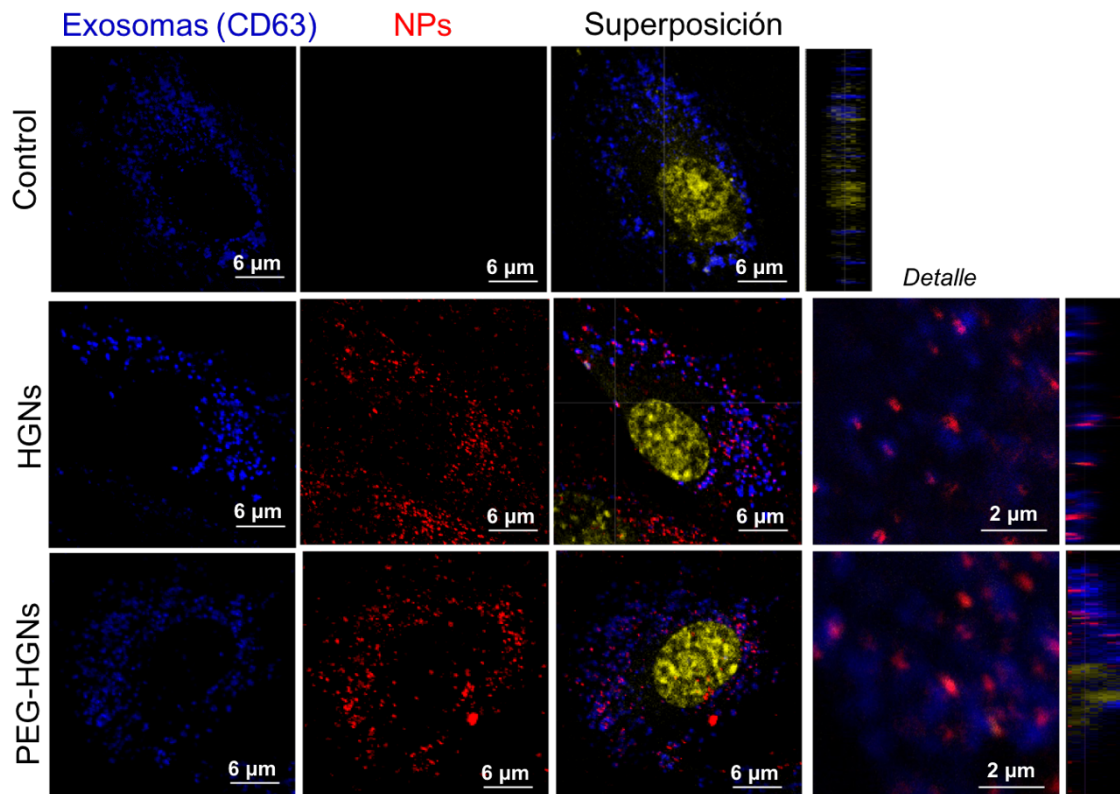


Figura 4.30. Co-localización de las HGNs y PEG-HGNs con CD63 en hpMSCs, por microscopía confocal.

Los exosomas secretados se aislaron por rondas sucesivas de ultracentrifugación y se analizó la presencia de partículas en su interior por microscopía electrónica. Las observaciones de TEM revelaron que gran parte de dichos PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} estaban cargados con, al menos, una partícula en su interior, confirmando de nuevo la eficacia de encapsulación obtenida por el método de captación natural (**figura 4.31**). Algunas imágenes muestran además la doble bicapa lipídica característica de los exosomas, que los diferencia de otras vesículas extracelulares.

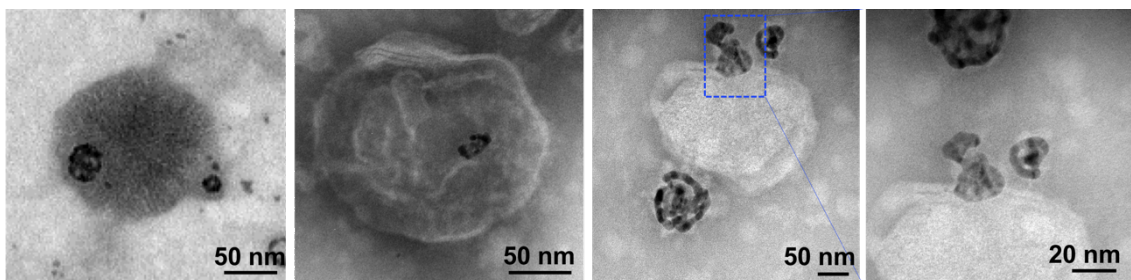


Figura 4.31. Imágenes de TEM de exosomas derivados de hpMSCs conteniendo PEG-HGNs.

Las imágenes TEM proporcionaron la distribución de tamaños de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} obteniéndose un diámetro medio de $126,2 \pm 30,6$ nm, similar al obtenido para los Exos^{hpMSCs} ($109,9 \pm 34,7$ nm). El análisis por NTA también reveló un

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

diámetro de 150 nm, similar al de los exosomas control (**figura 4.32**). La **tabla 4.5** recoge la concentración (obtenida por NTA) de exosomas secretados por células en presencia o ausencia de PEG-HGNs, así como el potencial zeta de los mismos. La cuantificación de exosomas purificados a partir del mismo número de células control y de células incubadas con las PEG-HGNs reveló que las primeras secretaban $2,53 \times 10^8$ vesículas/mL mientras que las células incubadas con partículas produjeron seis veces más $13,65 \times 10^8$ vesículas/mL. Por otro lado, el análisis del potencial zeta a pH 7 de los exosomas reveló una carga superficial similar de $-8,28 \pm 3,42$ mV y $-10,26 \pm 0,17$ mV para los exosomas Exos^{hpMSCs} y los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} respectivamente, sugiriendo de nuevo la presencia de partículas preferentemente en el interior de los exosomas en lugar de adheridas a su superficie.

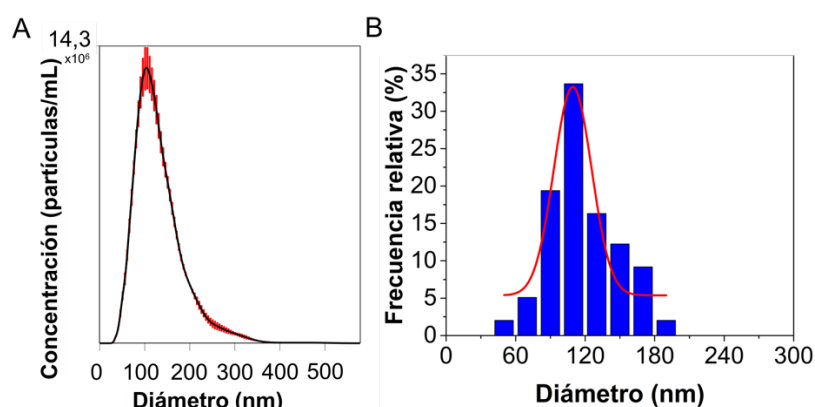


Figura 4.32. Tamaño de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} por el método de captación natural, medido mediante: A) NTA y B) Fotografías de TEM.

Tabla 4.5. Concentración y potencial zeta de exosomas secretados por las hpMSCs en presencia o ausencia de PEG-HGNs.

	Partículas/mL	Potencial zeta (mV)
Exos ^{hpMSCs}	2.53×10^8	$-8,28 \pm 3,42$
PEG-HGNs-Exos ^{hpMSCs}	13.65×10^8	$-10,26 \pm 0,17$

Para confirmar identidad exosomal de las vesículas extracelulares aisladas, se evaluaron mediante WB la expresión de las tetraspaninas CD9 y CD63. El análisis demuestra la expresión de estas proteínas asociadas a exosomas (señales a 21 y 53 kDa, respectivamente). De hecho, el análisis de la expresión de proteínas a partir de la misma cantidad de células en presencia o ausencia de partículas, reveló una mayor expresión de CD9 y CD63 en presencia de PEG-HGNs comparado con los exosomas control (**figura 4.33**), donde también aparece la expresión de α -actina como gen *housekeeping* (control). De nuevo, al igual que en el caso de las células B16-F10, estos resultados indican que la presencia de partículas en el interior celular estimula

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

significativamente la secreción de exosomas, dando lugar a mayores concentraciones en el medio, de acuerdo con las medidas de NTA.

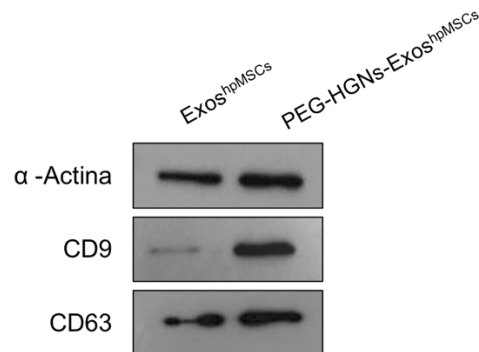


Figura 4.33. Expresión de α -actina, CD9 y CD63 en exosomas derivados de células hpMSCs incubadas en ausencia (control) o en presencia de PEG-HGNs.

4.3.2.4. Exos^{hpMSCs} como vectores selectivos de PEG-HGNs

A continuación, se presenta el estudio de la transferencia e intercambio de PEG-HGNs tanto en cultivos independientes de diferentes tipos de células como en co-cultivos.

Co-cultivo entre hpMSCs y monocitos THP1

Como se ha explicado, estos co-cultivos se incubaron con la proporción óptima de un 50% de medio DMEM con FGF al 10 % y un 50% de medio RPMI. La **figura 4.34** muestra imágenes de microscopía de fluorescencia de cultivos independientes de hpMSCs y THP1 y del co-cultivo de ambas poblaciones celulares. Para facilitar la identificación, las hpMSCs y los monocitos fueron marcados fluorescentemente con las sondas PKH67 (verde) y PKH26 (rojo), respectivamente.

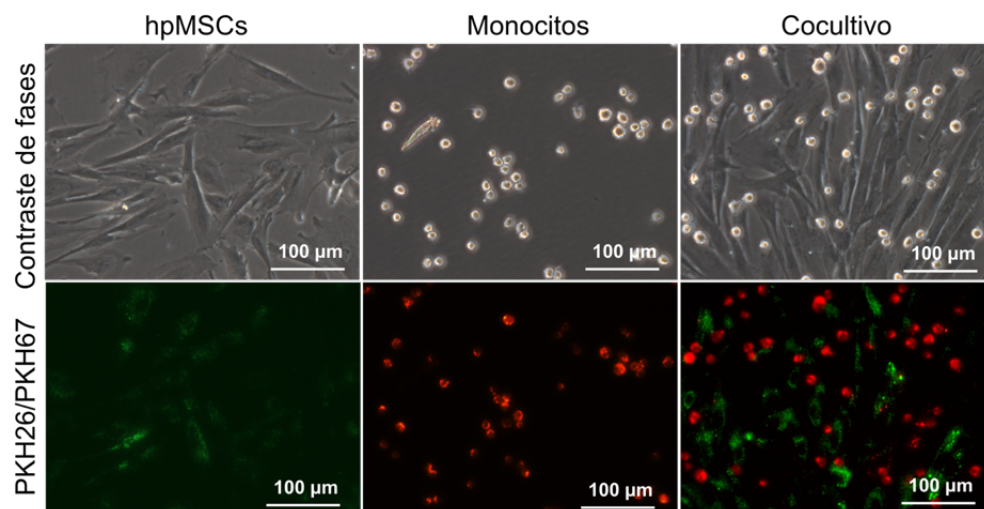


Figura 4.34. Fotografías de contraste de fases o de fluorescencia obtenidas con un microscopio invertido de un cultivo independiente de hpMSCs (verde), un cultivo independiente de monocitos (rojo) y un co-cultivo de ambas líneas celulares.

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

La citometría de flujo permitió comprobar que las condiciones de co-cultivo no afectaban a la expresión de proteínas y marcadores específicos de ambas líneas celulares. La **figura 4.35** muestra que el patrón de expresión de dichos marcadores era igual tanto en las células cultivadas en la modalidad de co-cultivo, así como independientemente, pasadas 24 h y 48 h de crecimiento.

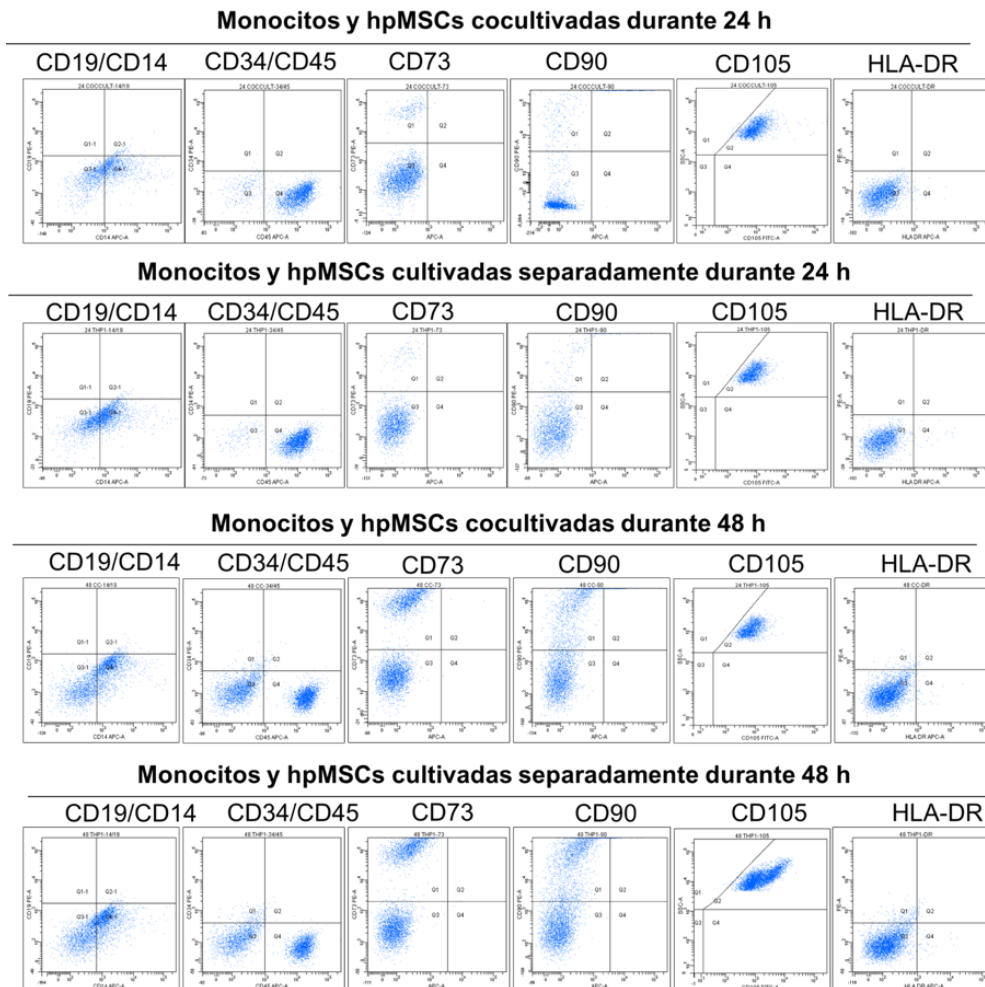


Figura 4.35. Gráficos de puntos (*dot plots*) de células hpMSCs y THP1 incubadas independiente o conjuntamente (co-cultivo) durante 24 y 48 h con expresión de marcadores de superficie característicos de ambas líneas celulares.

Se verificó la expresión de CD19 (marcador de linaje de linfocitos B expresado en monocitos y ausente en hpMSCs) y de CD14 (factor de diferenciación de monocitos, presente en dichas células y ausente en hpMSCs), de la proteína CD45 en las células TPH1, (antígeno expresado en todos los leucocitos y por tanto en los linfocitos también, pero ausente en hpMSCs) y la ausencia de expresión de CD34, (marcador específico de progenitores sanguíneos). La expresión de CD73 también se observó en los co-cultivos y en los cultivos independientes de hpMSCs. Esta proteína media la adhesión en MSCs, y es positiva para las hpMSCs y ausente para los monocitos. El CD90

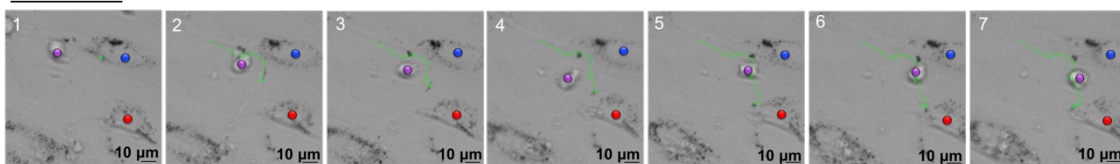
4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

(marcador de precursores tempranos de mesenquimales con potencial diferenciación a osteoblastos) se observó positivo para las hpMSCs y negativo para los THP1. Finalmente, se corroboró la expresión de endoglina, también conocida como CD105, con expresión positiva para hpMSCs y para THP1.

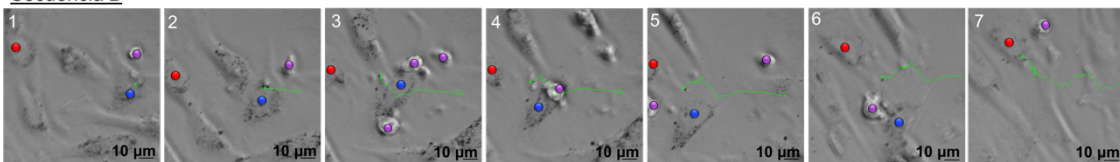
Estudio de la transferencia de PEG-HGNs-Exos entre células

La especificidad del intercambio de PEG-HGNs-Exos entre células co-cultivadas, se evaluó por microscopía de célula viva (*time-lapse*) durante 72 horas y cuantificando la cantidad de oro por MP-AES pasadas 24 y 48 h. Las capturas de vídeo en tiempo real (**figura 4.36**) muestran dos secuencias correspondientes a un co-cultivo de células madre (preincubadas con las PEG-HGNs) y monocitos THP1 control. Las NPs aparecen en la fotografía como puntos negros en el interior de las hpMSCs. Los resultados revelan como una célula hpMSCs parental (marcada en rojo) secreta un agregado de PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} (indicado en verde) en presencia de un monocito THP1 (señalado en morado). Dicho agregado de PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} es secretado al medio de cultivo en la proximidad de células fagocíticas del sistema inmune THP1. Sin embargo, es capturado preferentemente por una célula receptora hpMSCs (indicada en azul).

Secuencia A



Secuencia B



● Célula hpMSCs receptora ● Célula hpMSCs parental ● Monocito → Seguimiento PEG-HGNs

Figura 4.36. Secuencias de imágenes obtenidas a partir de un vídeo *time-lapse* de un co-cultivo de células madre (preincubadas con las PEG-HGNs) con monocitos THP1 control. La trayectoria verde indica como en presencia de un monocito, un agregado de PEG-HGNs es secretado por una célula parental hpMSC y capturado por una célula hpMSC receptora.

Estos resultados se corroboraron cuantitativamente por el estudio de MP-AES (**figura 4.37.A**). Al poner en contacto PEG-HGNs (sin haber sido incubadas previamente con ningún tipo celular) tanto en un co-cultivo de hpMSCs y THP1, como en cultivos independientes de ambas líneas celulares, las partículas eran capturadas fácilmente y sin diferencias significativas por las dos líneas células (ambas poblaciones celulares capturaron aproximadamente entre 1,5 y 2 μg de Au tras 24 h y 48 h de crecimiento en ambas modalidades). Por lo contrario, cuando las PEG-HGNs fueron preincubadas

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

durante 24 horas con las hpMSCs (tiempo óptimo de incubación de las partículas con las células madre) y posteriormente, éstas hpMSCs conteniendo las partículas se co-cultivaban con monocitos, el nivel de partículas en los monocitos disminuyó significativamente (la población de THP1 únicamente capturó 0,09 μg de oro tras 24 h y 48 h de crecimiento). Por su parte, el nivel de Au en las hpMSCs se mantuvo en torno a 2 μg , sugiriendo que las partículas emitidas eran capturadas preferentemente por sus células parentales, en lugar de por los THP1. Estos resultados concuerdan la captura selectiva de las PEG-HGNs tras ser liberadas por sus células secretoras, probablemente mediada por exosomas.

El experimento simétrico se llevó a cabo incubando las PEG-HGNs previamente durante 24 h con las células THP1 y co-cultivando estos monocitos conteniendo las partículas con hpMSCs control. En este caso, la cantidad de partículas internalizadas por las hpMSCs, fue significativamente menor y muchas NPs quedaron en el medio una vez fueron secretadas por los monocitos. La **figura 4.37.B**, analiza la cantidad de oro presente en cada población celular tras 48 h, y muestra como la práctica totalidad del oro liberado por los monocitos al medio extracelular se mantuvo en dicho medio (en lugar de ser capturado por las células madre). Este hecho confirma la preservación del direccionamiento aportado por los monocitos, probablemente mediado por los exosomas. De hecho, se ha reportado que cuando los monocitos (células fagocíticas) internalizan cuerpos presentes en el medio, estos son procesados en la ruta endosoma-exosomal, liberando dichas partículas de nuevo al medio proporcionándoles una huella celular y evitando que sean capturados por otras células.¹⁹³

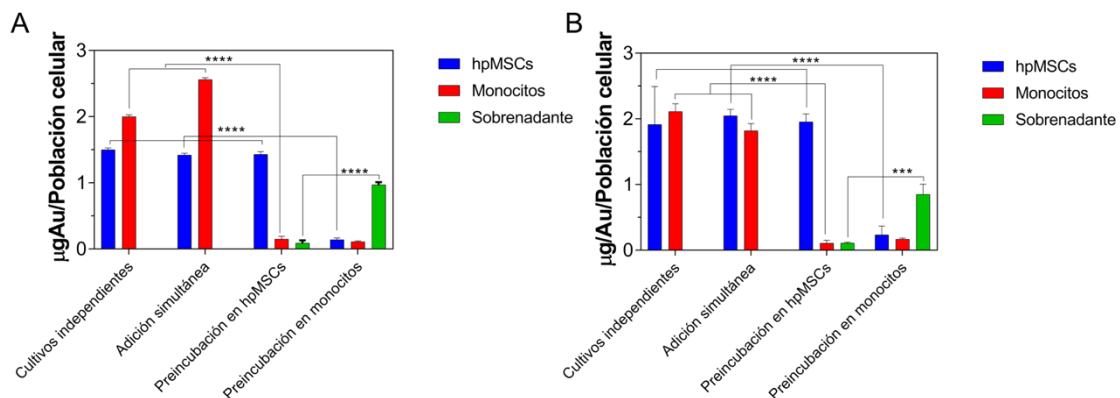


Figura 4.37. Análisis de Au por MP-AES en poblaciones de hpMSCs y THP1 cultivadas en diferentes condiciones: cultivos independientes de ambas líneas celulares, co-cultivos de las dos líneas celulares con adición de PEG-HGNs, preincubación de las PEG-HGNs en hpMSCs y posterior co-cultivo con monocitos y preincubación de las PEG-HGNs en monocitos y posterior co-cultivo con hpMSCs control. Las gráficas muestran la distribución del Au en ambas poblaciones celulares pasadas A) 24 h y B) 48 h de estudio.

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

La **figura 4.38** muestra un experimento similar, pero con exosomas aislados previamente tras ser cargados PEG-HGNs en el proceso de captación natural con ambas líneas celulares. Al incubar los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} con un co-cultivo de hpMSCs y THP1, estos fueron capturados preferentemente por las hpMSCs (0,12 y 0,23 μ g de oro en la población de hpMSCs tras 24 y 48 h de co-cultivo, respectivamente) y únicamente una cantidad minoritaria de oro fue captado por los monocitos (0,015 μ g de oro pasadas 24 h 48 h de co-cultivo). Pasadas 48 horas, gran parte de los exosomas con las partículas se habían internalizado en las hpMSCs y apenas se observó oro en el sobrenadante o en la población de THP1. Por lo contrario, cuando los PEG-HGNs-Exos^{THP1} se pusieron en contacto con un co-cultivo de células madre y monocitos, como la cantidad de oro internalizada por las hpMSCs fue considerablemente menor y la mayoría de los PEG-HGNs-Exos^{THP1} quedaban en disolución sin ser internalizados (resultados similares a los mostrados en la **figura 4.31**).

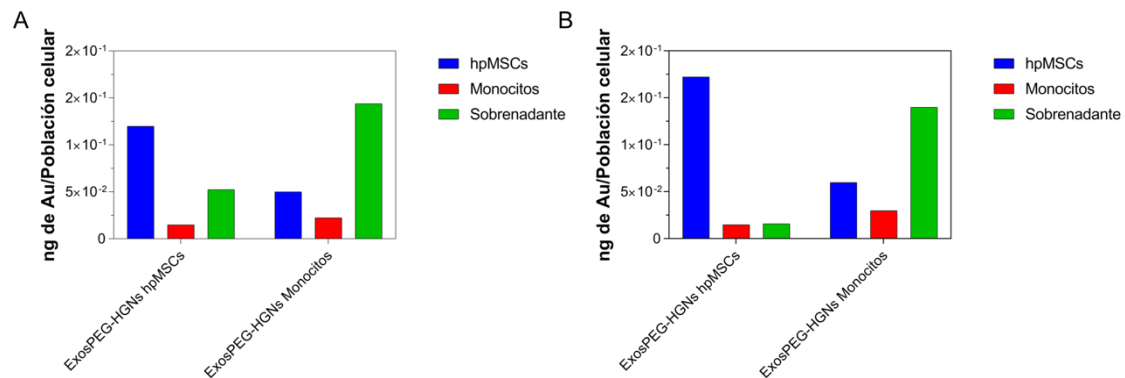


Figura 4.38. Captura de exosomas cargados con PEG-HGNs derivados de hpMSCs y de monocitos THP1 en co-cultivos de ambas líneas celulares tras A) 24 y B) 48 h de crecimiento.

La secuencia de imágenes capturada a partir de los vídeos de célula viva obtenidos por microscopía *time-lapse* (**figura 4.36**), así como los resultados de MP-AES recogidos en las **figura 4.37** y **figura 4.38**, demuestran la captura selectiva de PEG-HGNs mediada por exosomas de acuerdo al origen celular de los mismos. Sin embargo, en algunos casos pudo apreciarse una captura inespecífica de las partículas (una pequeña fracción de oro captada por células no parentales). Esto puede explicarse como resultado de la presencia de partículas desnudas remanentes en el medio o de que una fracción de las mismas sea secretada por una ruta no exosomal, careciendo de la especificidad aportada por estas vesículas extracelulares.

Para validar esta hipótesis en otros sistemas, el estudio de captación de PEG-HGNs se repitió con monocitos THP1 y una línea tumoral (células B16-F1). La **figura 4.39** revela de nuevo la captación dependiente de la línea celular: cuando las células se cultivaban independientemente y se añadían PEG-HGNs, cada línea celular seguía su

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

propia cinética de internalización. Igualmente, al añadir PEG-HGNs al co-cultivo de ambas células, se observó el mismo patrón de internalización que en los cultivos independientes. Sin embargo, si las partículas se preincubaban con células B16-F10 y posteriormente estas células tumorales se co-cultivaban con monocitos, únicamente una fracción pequeña de las partículas era captada por monocitos (0,089 μg de oro). Contrariamente, si las PEG-HGNs se preincubaban con los monocitos, al co-cultivar éstos con células B16-F1 control, sólo una pequeña cantidad de oro se captaba por las células tumorales (0,042 μg de oro). Estos resultados corroboran la transferencia intercelular selectiva de las PEG-HGNs mediada por exosomas.

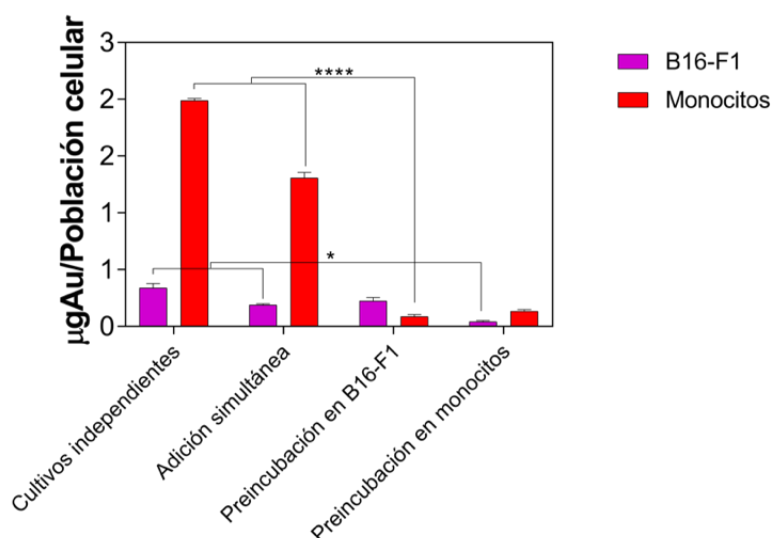


Figura 4.39. Análisis de Au por MP-AES en poblaciones de B16-F1 y THP1 cultivadas durante 24 h en diferentes condiciones: cultivos independientes de ambas líneas celulares, co-cultivos de ambas líneas celulares con adición simultánea de PEG-HGNs, preincubación de las PEG-HGNs en B16-F1 y posterior co-cultivo con monocitos y preincubación de PEG-HGNs en monocitos y posterior co-cultivo con B16-F1.

4.3.3. Conclusiones de esta sección

La incubación de las PEG-HGNs con distintos tipos celulares, y en particular con hpMSCs, permite su eficaz encapsulación en los exosomas derivados de las células correspondientes sin alterar su morfología, propiedades y funcionalidad. Esta encapsulación se produce gracias a la incorporación exitosa de las partículas en la ruta de biogénesis de los exosomas. Se verificó la especificidad y selectividad de la comunicación intercelular mediada por exosomas de acuerdo a la célula de origen del exosoma. Esto se ha confirmado con diversas líneas celulares (incluidas las propias células madre, células del sistema inmune y células tumorales), en las que se evaluó la cantidad de partículas en su interior por microscopía *time-lapse* y por MP-AES al incubarse de manera independiente o en co-cultivos.

4.4. Encapsulación de *Perfecta* en el interior de exosomas tumorales B16-F10 y de mMSCs

En esta sección se muestran los resultados referentes a la encapsulación de la molécula *Perfecta* en exosomas derivados de células metastásicas B16-F10 y células madre de médula ósea de ratón (mMSCs) empleando el proceso de biogénesis natural. La preparación de la emulsión y la caracterización de los exosomas por resonancia magnética nuclear (NMR), DLS y NTA se realizaron durante una estancia de investigación en los laboratorios del Prof. Pierangelo Metrangolo (Universidad Politécnica de Milán, Italia).

4.4.1. Experimental

4.4.1.1. Síntesis y caracterización de la emulsión de *Perfecta* con lecitina

La emulsión de *Perfecta* se llevó a cabo teniendo en cuenta el procedimiento indicado en bibliografía.¹⁹⁴ En resumen, 40 mg de lecitina se disolvieron con 44 μ L de aceite de cártamo y se incubaron durante 1 minuto a 80 °C, seguido de un pulso de sonicación (SONIC Vibracell, Newtown, CT, 20 V) durante 30 segundos con una amplitud del 80 % . Por otro lado, 50 mg de *Perfecta* sólida se incubaron a 80 °C hasta su fusión completa. Finalmente, la lecitina incubada con el aceite de cártamo se añadió al vial de *Perfecta* fundida y la mezcla se calentó a 80 °C durante 15 minutos seguido de un ciclo de sonicación al 80 % de amplitud durante 30 segundos. La secuencia de calentamiento y sonicación se repitió 8 veces.

Además de la emulsión con lecitina, se desarrolló un segundo método alternativo para solubilizar esta molécula hidrofóbica en un disolvente acuoso. Para ello, se suspendieron 5 mg de *Perfecta* en 100 μ L de DMSO y se incubaron durante 20 segundos en un baño de ultrasonidos hasta su dispersión completa. La emulsión de *Perfecta* fue caracterizada por microscopía electrónica (siguiendo el protocolo detallado con anterioridad) y por NMR. El análisis del flúor por NMR se realizó en un equipo Bruker AV400. En concreto, 400 μ L de la muestra se añadieron a 40 μ L de D₂O (10:1, v:v) siendo finalmente introducidos en un tubo de NMR. Como referencia se utilizó ácido trifluoroacético (TFA) con un pico de emisión a 75,45 ppm aproximadamente.

4.4.1.2. Ensayos de citotoxicidad e internalización

La toxicidad de las dos formulaciones de *Perfecta* se estudió en células mMSCs y B16-F10 usando el método Alamar Blue ya descrito. Se añadió la emulsión a las células a diferentes concentraciones: 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,06; 0,03; 0,015 mg/mL (relativas a la cantidad de *Perfecta*) y se repitió el experimento con las mismas

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

cantidades de *Perfecta* disueltas en medio de cultivo con DMSO. A modo de control, se evaluó también la toxicidad de DMSO en ausencia de *Perfecta*.

El grado de internalización de *Perfecta* empleando ambas formulaciones, se evaluó por microscopía confocal (siguiendo las indicaciones mostradas en el capítulo 3). Para ello, el grupo del Prof. Metrangolo ha puesto a punto una emulsión de *Perfecta* en lecitina con una sonda fluorescente (Rodamina B ex/em 553/627 nm). Las células se sembraron sobre cubreobjetos estériles en placas de 24 pocillos, y posteriormente, esta emulsión fluorescente se incubó con las mMSCs y las células B16-F10 (a la dosis subcitotóxica previamente establecida) durante 2, 4, 6, 8 y 24 horas y las muestras se visualizaron por microscopía confocal. La cantidad de *Perfecta* en el interior de las células tratadas con ambos tipos de formulaciones, se cuantificó también a partir de los precipitados celulares por NMR pasadas 24 h de su incubación con dicha molécula. De nuevo, se empleó TFA como referencia en el análisis por NMR para determinar la cantidad de moléculas de *Perfecta* presentes en el interior celular.

4.4.1.3. Aislamiento y caracterización de *Perfecta*-Exos

El aislamiento de los *Perfecta*-Exos se realizó siguiendo el protocolo detallado en el capítulo 3, e incubando las células correspondientes con *Perfecta* en emulsión con lecitina (*Perfecta*-Exos^{mMSCs} y *Perfecta*-Exos^{B16-F10}). La caracterización de los exosomas se llevó a cabo tanto por técnicas fisicoquímicas (TEM, NTA, DLS, potencial zeta), como por técnicas biológicas (ensayo de co-localización con vesículas positivas para CD63 y WB). Por su parte, presencia de *Perfecta* en el interior de estas vesículas se cuantificó por NMR durante la estancia de investigación en la Universidad Politécnica de Milán. Para ello, se realizaron 264 ciclos a temperatura ambiente utilizando un espectrómetro Bruker AV400 operando a 500 y 475 MHz. En concreto, 400 μ L de la muestra se añadieron a 40 μ L de D₂O (10:1) siendo finalmente introducidos en un tubo de NMR y como referencia se utilizó TFA con un pico de emisión a 75,45 ppm aproximadamente.

Por su parte, las medidas de los tiempos de relajación T₁ y T₂ registrados a 305 K se realizaron en el mismo espectrómetro operado a 400 MHz. Las secuencias de inversión-recuperación y la secuencia de Car-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) se utilizaron para calcular los tiempos de relajación T₁ y T₂, respectivamente.

4.4.1.4. Análisis de la estabilidad de los *Perfecta*-Exos

La estabilidad de los *Perfecta*-Exos^{mMSCs} y *Perfecta*-Exos^{B16-F10} se evaluó pasados 1, 5 y 7 días tras su purificación. Para ello, se determinó por NMR la cantidad

de 19-Flúor liberada al medio (PBS suplementado con un 10 % de FBS) en el que se encontraban dichos exosomas a lo largo del tiempo.

4.4.2. Resultados y discusión

4.4.2.1. Caracterización de la emulsión de *Perfecta* con lecitina

Los emulsificantes para aplicaciones biomédicas deben cumplir con una serie de características: baja toxicidad, estabilidad química y capacidad de disminuir la tensión interfacial. Algunos surfactantes como pluronic, oleato de potasio o fosfolípidos naturales, así como mezclas de lípidos y surfactantes (p.ej. aceite de cártamo con colesterol y/o glicerina) han sido utilizados para solubilizar este tipo de moléculas en medios acuosos.¹⁹⁵ El aceite de cártamo proporciona otras ventajas tales como una disminución en el fenómeno de maduración de Ostwald que produce un crecimiento de las partículas más grandes a expensas de las más pequeñas.¹⁹⁶

La **figura 4.40** muestra un esquema de la emulsión sintetizada en este estudio para encapsular la molécula de *Perfecta*, en cuyo interior se encontraría la fase hidrofóbica con el aceite de cártamo y la molécula disuelta. Esta fase oleica, está rodeada por la lecitina (con la fosfatidilcolina como principal componente, aunque también contiene fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y ácido fosfatídico).

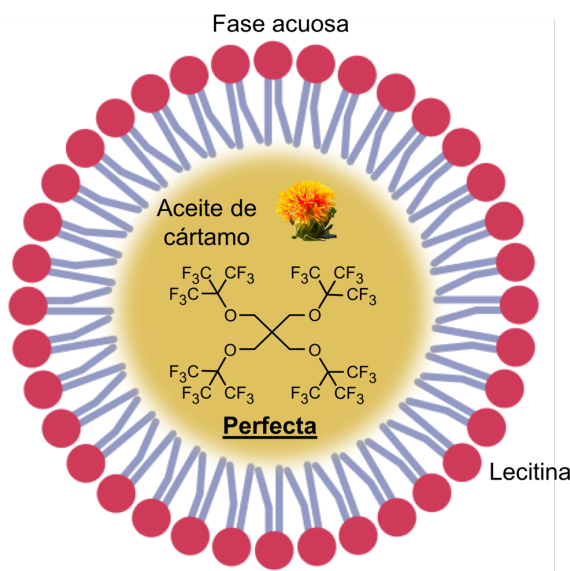


Figura 4.40. A) Esquema de la emulsión de *Perfecta* sintetizada con lecitina y aceite de cártamo.

Las fotografías de microscopía electrónica de la emulsión de *Perfecta* (**figura 4.41A**) muestran una suspensión de pequeñas partículas o gotas con morfología redondeada conteniendo en su interior la *Perfecta* insoluble en agua. Estas gotas tenían un tamaño alrededor de 150 nm de diámetro (**figura 4.41.B**). Resultados previos de

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

DLS mostraban que esta estrategia generaba dispersiones de *Perfecta* homogéneas y estables en disolución acuosa durante varias semanas a temperatura ambiente.¹⁹⁴

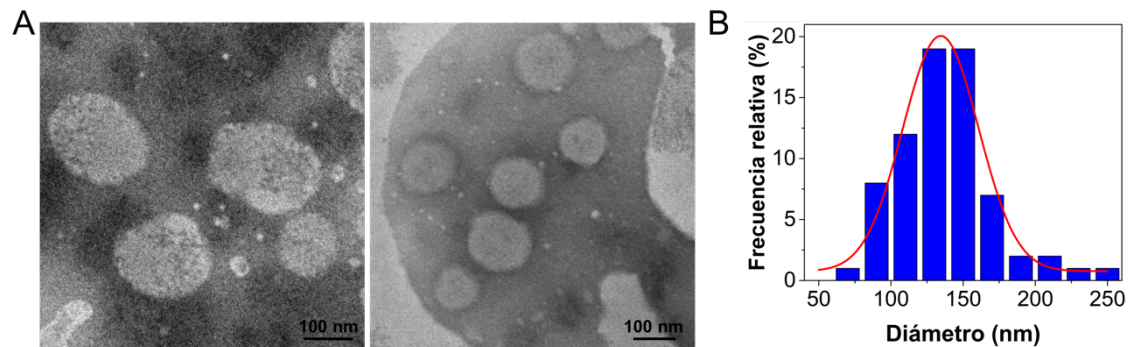


Figura 4.41. A) Fotografías de TEM de la emulsión de *Perfecta*. B) Distribución de tamaños de la emulsión.

El análisis de NMR de las emulsiones de *Perfecta* sin y con fluorescencia (**figura 4.42**), indica una cantidad de átomos de flúor/mL similar a la reportada en bibliografía¹⁹⁴: $1,23 \times 10^{21}$ ($3,43 \times 10^{19}$ moléculas de *Perfecta*/mL) en la emulsión no fluorescente frente a $1,22 \times 10^{21}$ ($3,43 \times 10^{19}$ moléculas de *Perfecta*/mL) cuando la emulsión era fluorescente. Estos resultados demuestran como el acoplamiento de la molécula de Rodamina B (ex/em 553/627 nm) a la emulsión no afectaba a la cantidad de *Perfecta* encapsulada en su interior.

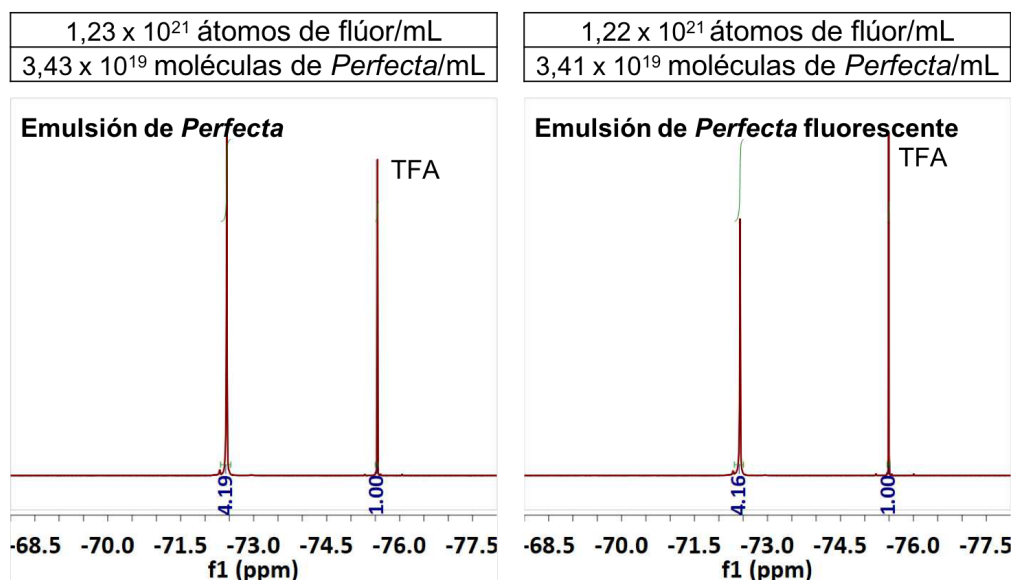


Figura 4.42. Caracterización de la cantidad de ¹⁹-Flúor por NMR en la emulsión de *Perfecta* sin y con fluorescencia.

4.4.2.2. Ensayos de citotoxicidad metabólica y de internalización celular

Los valores de citotoxicidad en células mMSCs y B16-F10 producidos por la emulsión de *Perfecta* se muestran en la **figura 4.43**. Los resultados indican que no hay

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

diferencias significativas en el porcentaje de viabilidad de células tratadas con la emulsión comparado con células control (sin tratar), algo esperable porque la lecitina es una mezcla natural de fosfolípidos polares y neutros que se encuentra entre los tensoactivos más utilizados. Además, la lecitina cuenta con un gran índice de tolerabilidad, una baja toxicidad y es biodegradable.¹⁹⁷ Los valores de viabilidad tanto de las células mMSCs como B16-F10 se encuentran por encima del 70 % a los tiempos estudiados (24 y 48 h).

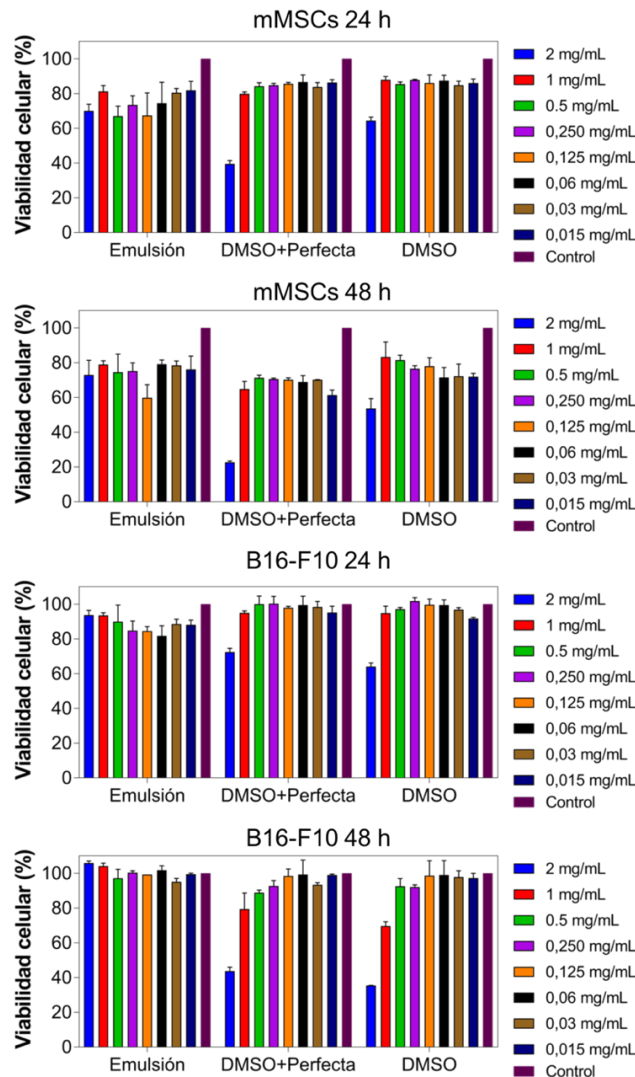


Figura 4.43. Toxicidad de la emulsión de *Perfecta* en las células mMSCs y B16-F10 pasadas 24 y 48 h de su incubación.

En el caso de la *Perfecta* en medio de cultivo con DMSO, es de destacar que las células tratadas con DMSO y *Perfecta*, y las células incubadas únicamente con DMSO, presentaban perfiles de citotoxicidad muy similares y dependientes de la dosis, sin diferencias significativas cuando la *Perfecta* estaba presente o no. Por tanto, esta disminución dosis-dependiente (particularmente en la más elevada; 2mg/mL), es

atribuible al DMSO y no a la *Perfecta*. De hecho, está ampliamente citado que esta molécula de naturaleza anfipática puede afectar significativamente al crecimiento de células cultivadas *in vitro* y afectar a procesos como su proliferación, supervivencia o diferenciación.¹⁹⁸ Además, se ha demostrado que el DMSO puede causar la hemólisis de los glóbulos rojos y reducir la actividad de las plaquetas, generando daños hematológicos.¹⁹⁹ Considerando estos resultados, se abandonó el abordaje con DMSO y se procedió a encapsular la *Perfecta* en exosomas utilizando la emulsión con lecitina.

La **figura 4.44** muestra la internalización de la emulsión de *Perfecta* en células mMSCs y B16-F10 a lo largo del tiempo evaluada por microscopía confocal. A las 2 y 4 h se observa una mínima cantidad de *Perfecta* en el interior del citoplasma de las mMSCs y gran parte de ella se localiza en la membrana. Sin embargo, a partir de las 6 h se puede ver acumulada en gran cantidad en su citoplasma. En el caso de las células B16-F10, puede observarse como este incremento significativo de la cantidad de emulsión de *Perfecta* en el interior de las células ocurre a partir de las 24 h y no de las 6 h como ocurría en las mMSCs. Las proyecciones ortogonales en dirección Z de las mMSCs y las B16-F10 tras 24 h de incubación con la emulsión, muestran una localización preferente de la misma en el interior del citoplasma en el caso de las primeras, mientras que, en el caso de las células metastásicas, la emulsión estaba mayoritariamente anclada a la superficie externa de la membrana (aunque una parte de ella puede verse también en el interior celular). La intensa captación de NPs por parte de las MSCs comparado con otras líneas celulares ha sido reportado previamente,^{156,200} y también se ha comprobado en este trabajo (ver **figuras 4.16 y 4.28**).

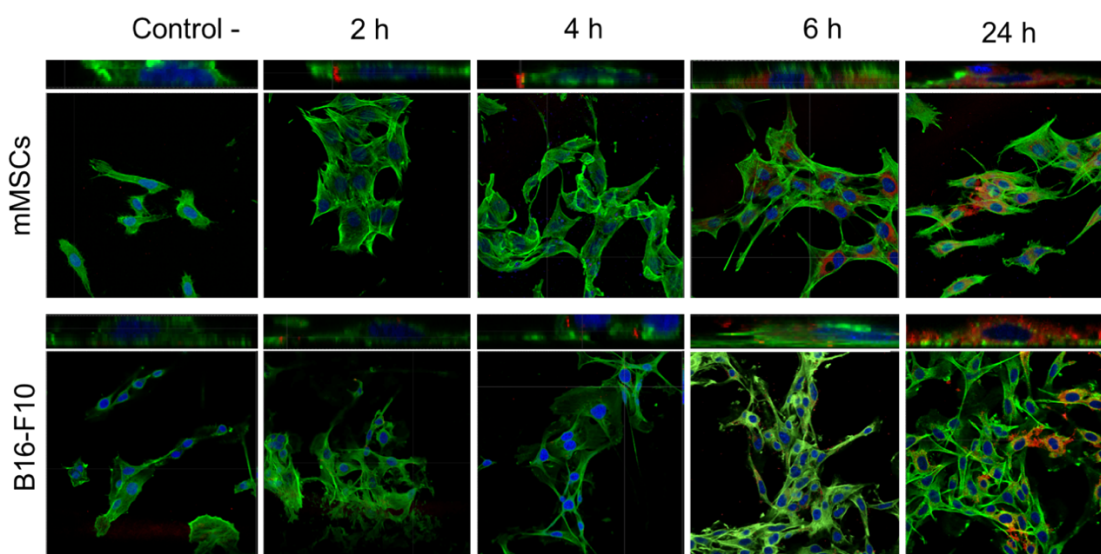


Figura 4.44. Internalización de la emulsión de *Perfecta* en células mMSCs y B16-F10 durante 2, 4, 6 y 24 horas. Azul (núcleo), verde (actina), rojo (emulsión de *Perfecta*). La figura muestra proyecciones Z de las adquisiciones de microscopía confocal.

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

El análisis de la cantidad de flúor presente en los precipitados de ambas líneas celulares (B16-F10 y mMSCs) cuando estos eran sometidos al tratamiento con la emulsión de *Perfecta* o con la *Perfecta* disuelta en DMSO, revelaron una gran cantidad de este elemento (y por tanto de *Perfecta*) cuando la molécula se adicionaba al medio de cultivo en forma de emulsión (**figura 4.45**).

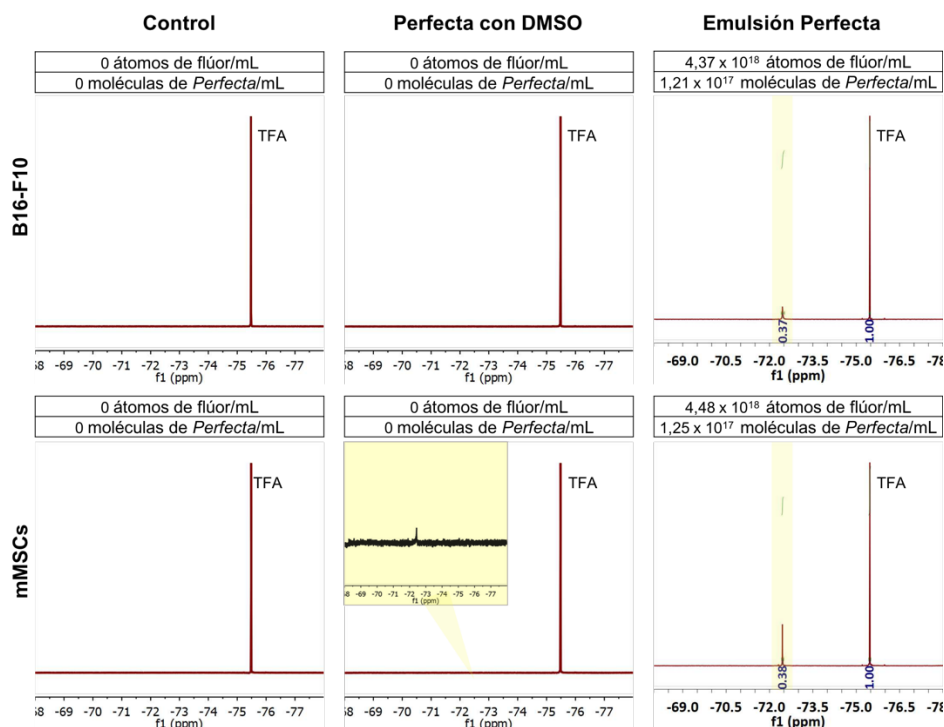


Figura 4.45. Resultados de NMR de los precipitados de células B16-F10 y mMSCs sin tratar, incubadas con *Perfecta* con DMSO o en forma de emulsión.

Por su parte, cuando las células se incubaban con la *Perfecta* en presencia de DMSO no se observó flúor en su interior (sin bien un pequeño pico imposible de cuantificar de *Perfecta* se obtuvo cuando las mMSCs eran incubadas con esta formulación). Como control negativo, se realizó un análisis NMR de células sin tratar.

Considerando estos resultados (junto con los expuestos en la **figura 4.43**) se decidió seguir trabajando únicamente con la *Perfecta* en forma de emulsión con lecitina. Además, a partir de los resultados de citotoxicidad metabólica y de microscopía confocal, se estableció 2 mg/mL como dosis subcitotóxica y 6 h como tiempo de incubación idóneo de la emulsión de *Perfecta*.

4.4.2.3. Caracterización de los *Perfecta*-Exos

Se purificaron los exosomas excretados en cultivos de mMSCs y de células B16-F10 tras la su incubación con la emulsión durante 6 horas a una concentración de 2 mg/mL. Las fotografías de TEM (**figura 4.46**) indican que la presencia de la *Perfecta* en

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

el interior de los exosomas no afecta a su morfología. Tanto en el caso de las mMSCs como de las B16-F10, los exosomas presentaban una morfología esférica y tamaño semejante a la de los exosomas control, con un tamaño medio de 100-150 nm de diámetro.

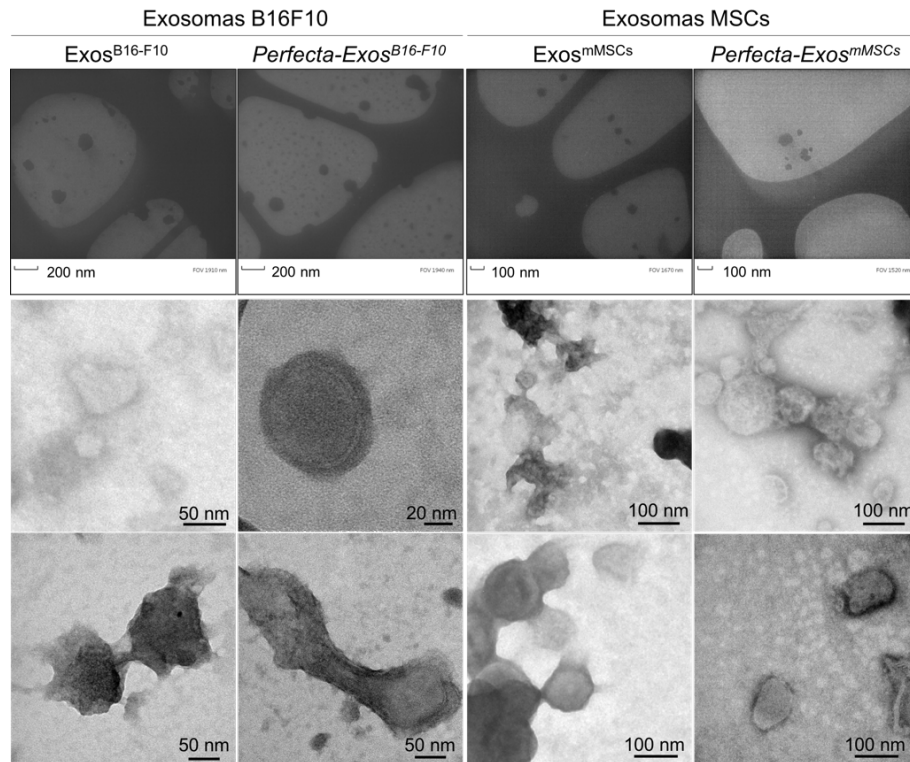


Figura 4.46. Fotografías de TEM de los exosomas derivados de mMSCs y células B16-F10 tanto en presencia como en ausencia de *Perfecta*.

Por último, los datos de NTA (**figura 4.47**) muestran que la presencia de esta molécula tampoco afectaba ni al diámetro ni a la concentración de partículas secretadas. La **tabla 4.6** resume la concentración y los diámetros hidrodinámicos obtenidos por DLS y NTA de exosomas derivados de células mMSCs y B16-F10 tanto en presencia como en ausencia de *Perfecta*.

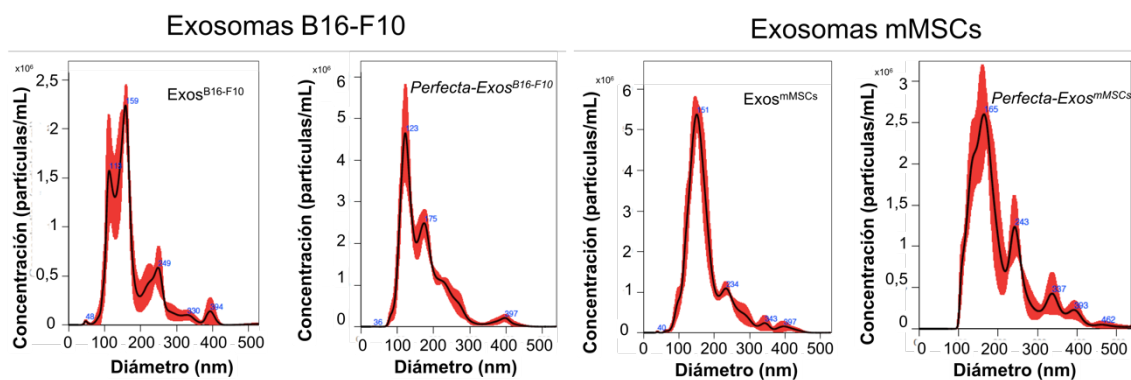


Figura 4.47. Resultados de NTA obtenidos de los exosomas derivados de mMSCs y B16-F10 con y sin presencia de *Perfecta*.

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

Tabla 4.6. Diámetro hidrodinámico de los exosomas derivados de ambas líneas celulares (control y tratadas con la emulsión de *Perfecta*). La tabla recoge resultados medidos por DLS y por NTA.

		mMSCs		B16-F10	
		Exos	<i>Perfecta</i> -Exos	Exos	<i>Perfecta</i> -Exos
Diámetro hidrodinámico	DLS	220,6 ± 22 nm	223,4 ± 22,4 nm	170,5 ± 31,6 nm	174,8 ± 24,4 nm
	NTA	178,2 ± 68,1 nm	207,4 ± 89 nm	175,6 ± 69,3 nm	172,8 ± 70 nm
Concentración	NTA	4,3 × 10 ⁹ partículas	2,9 × 10 ⁹ partículas	1,8 × 10 ¹⁰ partículas	7,4 × 10 ¹⁰ partículas

El análisis por WB tanto de un gen *housekeeping* (GAPDH) como de las proteínas exosomales (CD63 y CD9) indica que la presencia de *Perfecta* en los exosomas derivados de ambas líneas celulares no afecta a la expresión de las proteínas estudiadas (**figura 4.48**).

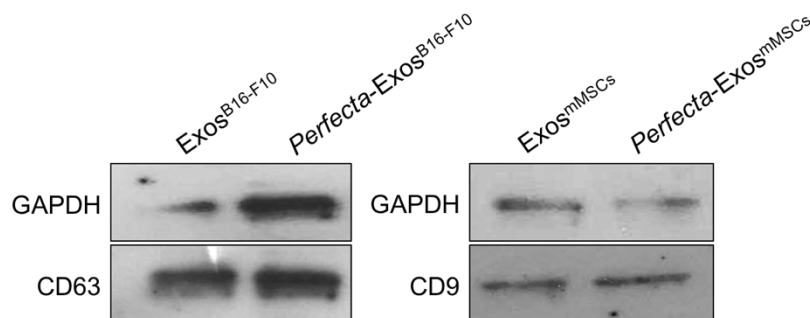


Figura 4.48. WB de los exosomas cargados con *Perfecta* y control (células B16-F10 y mMSCs).

El potencial zeta de los *Perfecta*-Exos^{mMSCs} y los *Perfecta*-Exos^{B16-F10} fue similar al obtenido para los exosomas derivados de células mMSCs control (Exos^{mMSCs}) y los Exos^{B16-F10} (**tabla 4.7**). Todos ellos presentaban una carga negativa característica de la membrana fosfolipídica que rodea estas vesículas extracelulares.

Tabla 4.7. Valores de potencial zeta obtenidos para los exosomas derivados de mMSCs y de células B16-F10 cultivadas en ausencia (control) y presencia de la emulsión de *Perfecta*.

	Exos	<i>Perfecta</i> -Exos
mMSCs	-22,55 ± 1,18 mV	-25,59 ± 1,61 mV
B16-F10	-17,90 ± 2,96 mV	-18,38 ± 1,61 mV

El análisis por NMR permitió cuantificar la cantidad de átomos de flúor (y, por tanto, de moléculas de *Perfecta*) en su interior. Además, conocido en número de exosomas en una muestra (obtenido por NTA) puede estimarse el número de átomos de flúor, así como la cantidad de moléculas de *Perfecta* por exosoma (**tabla 4.8**), ya que cada molécula de *Perfecta* contiene 36 átomos de flúor. Como puede observarse, los

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

resultados obtenidos en las diferentes síntesis fueron altamente reproducibles entre sí, demostrando la robustez del método de carga de *Perfecta*. Es interesante destacar que las mMSCs producían exosomas con más cantidad de *Perfecta* en su interior comparado con los derivados de las células B16-F10 (un orden de magnitud superior). Este resultado va en concordancia con los resultados de internalización celular de la *Perfecta* mostrados en la **figura 4.44**, en los cuales se demuestra que las mMSCs internalizan significativamente más cantidad de *Perfecta* que las células metastásicas, y por lo tanto hay una mayor cantidad de este molécula susceptible de ser secretada en los exosomas.

Tabla 4.8. Medidas de NMR y de NTA en exosomas derivados de ambas líneas celulares para obtener la cantidad de átomos de flúor y de moléculas de *Perfecta* presentes en cada exosoma.

	Exos ^{B16F10}		Exos ^{MSCs}	
	Átomos F/Exosoma	Moléculas <i>Perfecta</i> /Exosoma	Átomos F/Exosoma	Moléculas <i>Perfecta</i> /Exosoma
Lote I	7.02×10^6	1.95×10^5	1.5×10^8	$4,2 \times 10^6$
Lote II	-	-	1.12×10^8	$2,7 \times 10^6$
Lote III	7.1×10^6	2×10^5	3.05×10^8	$8,4 \times 10^6$
Lote IV	2.26×10^7	$6,2 \times 10^5$	6.59×10^7	$1,8 \times 10^6$
Media	1.22×10^7	3.4×10^5	1.58×10^8	$4,2 \times 10^6$

Por último, se evaluaron los tiempos de relajación T1 y T2 (**tabla 4.9**). Hasta la fecha, no existen publicaciones en las que se encapsulen moléculas superfluoradas en exosomas para hacer imagen por MRI y por tanto, no hay resultados con los que comparar los datos obtenidos en esta sección. Sin embargo, los tiempos de relajación T1 y T2 se corresponden con los de la molécula de *Perfecta* desnuda previamente publicados (T1/T2 690/202).²⁰¹

Tabla 4.9. Tiempos de relajación T1 y T2 obtenidos para los exosomas cargados con *Perfecta* derivados de ambas líneas celulares.

	T1 (MS)	T2 (MS)
<i>Perfecta</i> -Exos ^{mMSCs}	670	327
<i>Perfecta</i> -Exos ^{B16-F10}	705	308

4.4.2.4. Evaluación de la estabilidad de los *Perfecta*-Exos

La estabilidad de los *Perfecta*-Exos^{mMSCs} y *Perfecta*-Exos^{B16-F10} se determinó midiendo la cantidad de flúor liberada al medio (PBS suplementado con un 10 % de

FBS) a lo largo del tiempo. La **figura 4.49** recoge los espectros de NMR del flúor presente en los sobrenadantes en los que se encontraban los exosomas cargados con la *Perfecta* pasados 1, 5 y 7 días de su aislamiento. Ni en el sobrenadante de los *Perfecta*-Exos^{mMSCs} ni de los *Perfecta*-Exos^{B16-F10}, se observó ninguna señal de *Perfecta* en el sobrenadante, indicativo de la ausencia de liberación de la molécula al medio y, por tanto, de su estabilidad durante, al menos, una semana.

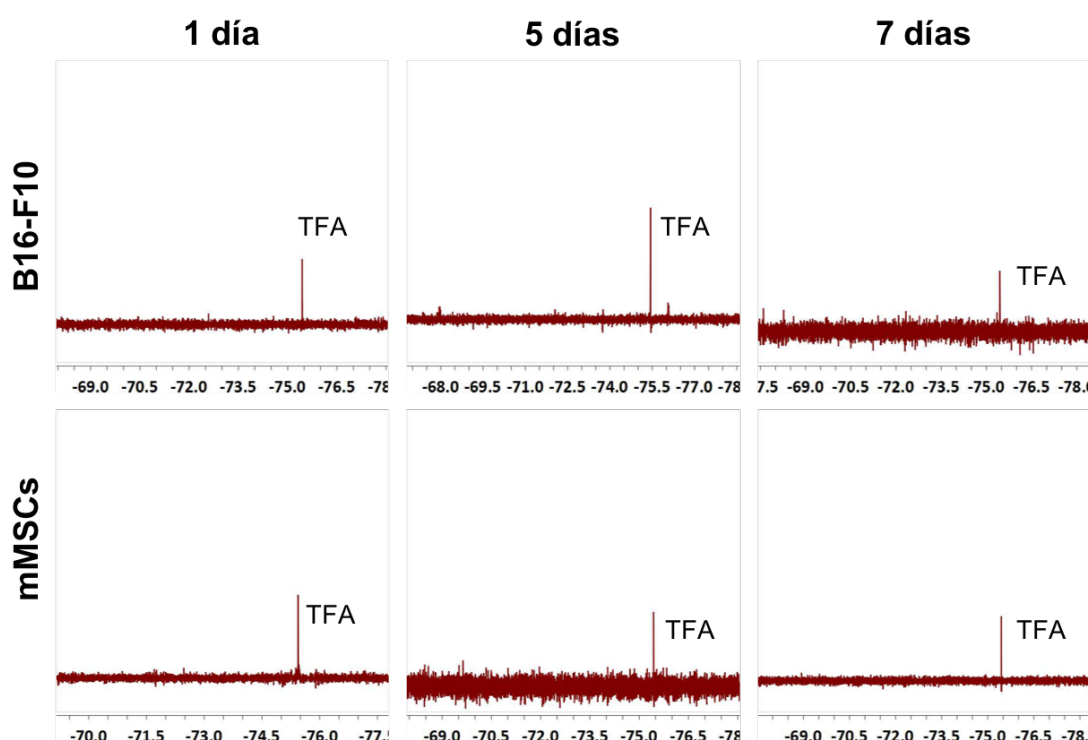


Figura 4.49. Análisis de NMR del sobrenadante de exosomas derivados de células B16-F10 y mMSCs cargados con *Perfecta* tras 1,5 y 7 días de su síntesis.

4.4.3. Conclusiones de esta sección

La emulsión de *Perfecta* no presentó citotoxicidad metabólica en ambos tipos celulares empleados (mMSCs y células B16-F10) a las dosis de estudio. Por lo contrario, cuando se solubilizó *Perfecta* en medio de cultivo con DMSO, se observó citotoxicidad a las dosis más altas, atribuida a la presencia del DMSO y no a la *Perfecta*. Los resultados de morfología, tamaño y estructura de los exosomas obtenidos por TEM, DLS y NTA corroboran que la presencia de *Perfecta* en los exosomas no afecta a su morfología ni integridad. Además, el nivel de expresión de las tetraspaninas CD9 y CD63 indica que la presencia de esta molécula tampoco afecta a la expresión de proteínas específicas de este tipo de vesículas. Por último, el análisis de ¹⁹F- NMR reveló un alto contenido de *Perfecta* en el interior de las vesículas extracelulares, particularmente en los exosomas derivados de células mMSCs. Este hecho se atribuyó al incremento en la

4. Encapsulación por métodos exógenos y células parentales

cantidad de *Perfecta* internalizada en las mMSCs comparado con las células metastásicas. Los tiempos de relajación T1 y T2 indican el potencial de este nuevo vehículo exosomal como vector de imagen y diagnóstico por MRI.

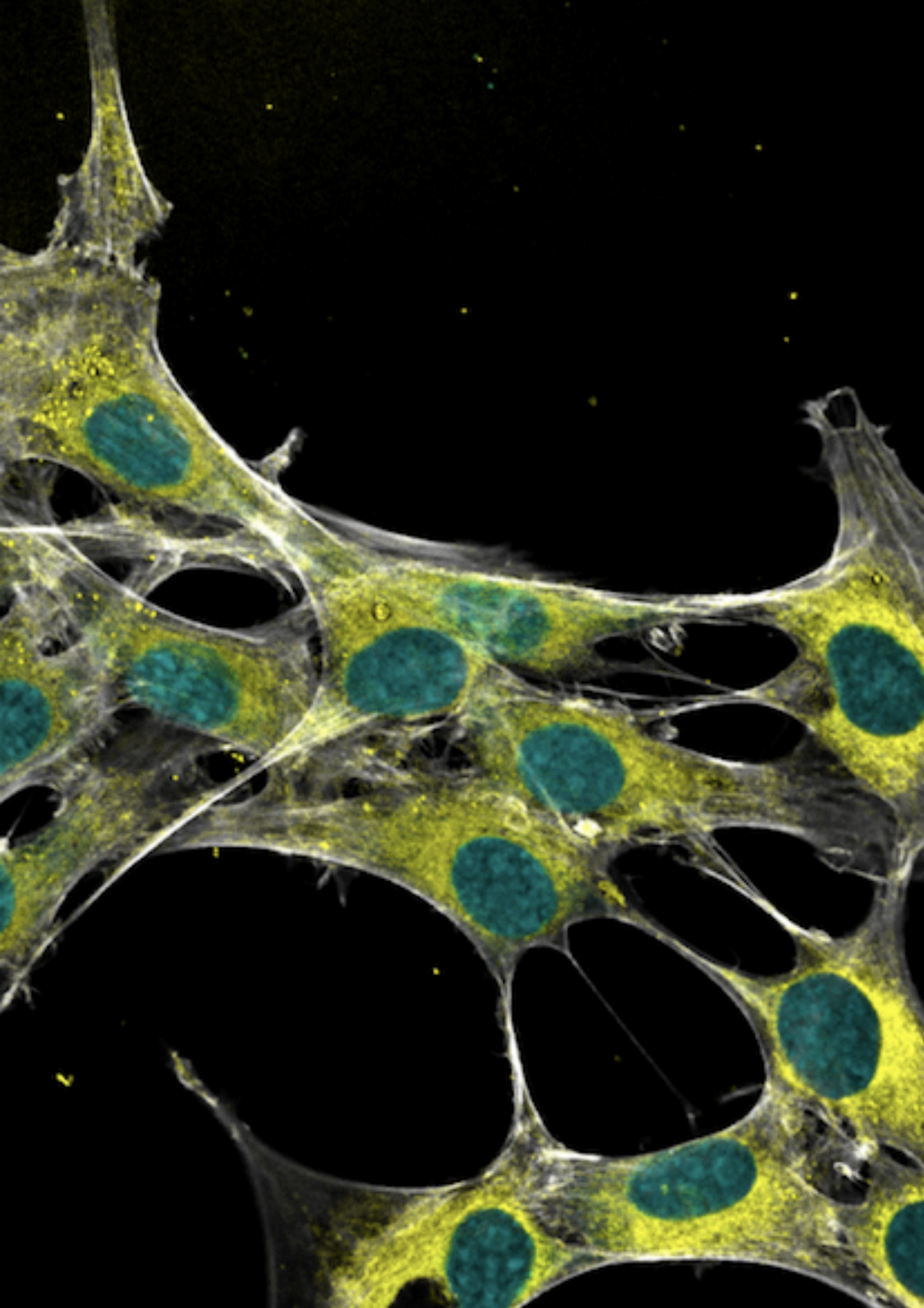


Imagen de microscopía confocal de células madre mesenquimales de médula ósea incubadas con la emulsión de *Perfecta*.

Marcaje de la actina (gris), *Perfecta* (amarillo) y núcleos (cian).

5. Generación in situ de nanopartículas en el interior de exosomas mediante reducción en atmósfera de monóxido de carbono

5. Generación *in situ* de nanopartículas en el interior de exosomas mediante reducción en atmósfera de monóxido de carbono

5.1. Introducción

En el capítulo anterior se han expuesto los métodos empleados para introducir partículas metálicas en el interior de exosomas: tanto las estrategias de difusión pasiva, que conducen a bajos rendimientos,^{149,178} como las de encapsulación forzada con métodos tales como la electroporación, sonicación, choques térmicos o incubación con algún agente permeabilizador y/o detergente, que consiguen incrementar la cantidad de partículas encapsuladas, a costa de un detrimento en la integridad de la pared exosomal.¹⁴⁹ También se ha demostrado que, tanto la eficacia de encapsulación como la integridad de los exosomas pueden mejorarse mediante el método de captación natural de las NPs por parte de las células parentales que se ha expuesto en dicho capítulo. Sin embargo, este método también cuenta con limitaciones importantes. En primer lugar, las partículas o fármacos de interés tienen que ser solubles en medio de cultivo, y biocompatibles para incubarse con las células secretoras. Además, no solo la toxicidad debe ser baja a las dosis requeridas, sino que las NPs tienen que tener una morfología, tamaño y carga superficial adecuados para ser endocitadas por las células diana y por tanto ser susceptibles de ser incorporadas en la ruta de biogénesis de los exosomas. Xie y *co/s.* analizaron la influencia de la forma de diferentes partículas de oro (estrellas, bastones y triángulos) en la vía de internalización empleada por cada una de ellas en macrófagos RAW264.7. Los tres tipos de NPs utilizaban un mecanismo de internalización dependiente de clatrina. Pero además, observaron que los nanobastones eran también capturados por mecanismos de endocitosis dependientes de caveolina y de balsas lipídicas y que, por otro lado; la entrada de los nanotriángulos a la célula estaba asociada a una reorganización de su citoesqueleto. La cantidad de nanoestrellas dentro de estos macrófagos fue baja, probablemente debido a que su morfología estrellada hacía que éstas interaccionaran fuertemente con la membrana celular impidiendo su paso al interior citoplasmático.²⁰² Por lo tanto, en ocasiones las partículas pueden no ser capturadas por las células en cantidades suficientes; y otras veces deben modificarse para ser vehiculizadas al interior celular, limitando la capacidad de encapsulación exosomal mediante la vía de captación natural.^{203,204,205,206} Con este abordaje de encapsulación indirecta, también resulta complicado controlar la carga de partículas en el interior de exosomas; a veces se obtienen exosomas vacíos y entre los

5. Encapsulación por reducción en atmósfera de CO

exosomas con partículas en su interior, no todos están cargados uniformemente. En resumen, con los métodos comentados, resulta difícil controlar la carga de las NPs en los exosomas.

Con el objetivo de solventar algunas de las limitaciones expuestas, en este capítulo se desarrolla una estrategia para generar las nanoestructuras directamente en el interior de los exosomas en vez de sintetizarlas y encapsularlas posteriormente. Para ello, se ha utilizado un reactante gaseoso (monóxido de carbono (CO)) como agente reductor de un precursor en forma de sal, previamente incorporado en el interior de los exosomas por difusión a través de su membrana fosfolipídica.

Es bien conocido que en la síntesis de partículas en fase líquida se puede regular el tamaño y la morfología de las NPs generadas gracias al control de la cinética de la reacción y al empleo de diferentes agentes reductores y reactivos orgánicos o inorgánicos que actúan como agentes estabilizadores.^{207,208} Sin embargo, cuando es posible utilizarla, la síntesis de partículas con reductores gaseosos tiene una ventaja adicional puesto que no queda un exceso de agente reductor y/o estabilizante en la solución de las NPs, lo que elimina la necesidad de etapas de purificación posteriores que añaden complejidad al proceso y que pueden afectar al grado de pureza de las NPs producidas e incrementar su agregación, limitando así su potencial aplicación.²⁰⁹ Algunos gases reductores, como el CO, son capaces de dirigir el crecimiento de los cristales gracias a una adsorción preferencial sobre determinadas caras cristalinas, permitiendo controlar la forma de las NPs. Se ha descrito el uso del CO para sintetizar NPs tanto en sistemas discontinuos como continuos (aunque también hay trabajos que describen el uso de otros gases inertes como H₂ como agentes reductores alternativos al CO).²¹⁰ Concretamente, el empleo de CO en sistemas discontinuos, fue reportado hace ya una década, cuando se sintetizaron los primeros nanotubos de platino gracias a la reducción del precursor acetilacetonato de platino (Pt(acac)₂) en presencia de oleilamina y/o ácido oleico. La presión parcial y el modo de contacto del CO tuvo un efecto sobre la forma de las partículas.²¹¹ Además de PtNPs, Young y *cols.* también emplearon CO como agente reductor para sintetizar AuNPs de diversos tamaños, combinando diferentes concentraciones del precursor HAuCl₄ con distintos flujos de CO para sintetizar partículas monodispersas con tamaños entre 4 y 100 nm.²⁰⁹ Por otro lado, Huang y *cols.*, desarrollaron un microreactor de flujo en espiral combinado con un reactor de flujo segmentado con burbujas de CO para generar AuNPs monodispersas de menos de 10 nm de diámetro. Para optimizar el sistema, sometieron varias disoluciones de HAuCl₄ con diferentes concentraciones a una atmósfera con diversas relaciones de flujo del líquido a gas.²¹² En otro trabajo realizado por Wu y *cols.*, se

5. Encapsulación por reducción en atmósfera de CO

sintetizaron diferentes nanocristales compuestos por aleaciones de Pt con cobalto, hierro, níquel o paladio, utilizando también CO como agente reductor de diferentes precursores. Controlando la reacción con el gas, estos nanocristales presentaron formas cúbicas u octaédricas, con altas propiedades catalíticas (51 veces más eficientes que catalizadores de Pt descritos hasta entonces).²¹³

Como ya se ha comentado en la introducción general de esta Tesis Doctoral, la membrana exosomal presenta características y exhibe propiedades similares a la membrana plasmática celular. La permeabilidad de esta membrana permite el transporte de moléculas esenciales (tales como glucosa, aminoácidos, etc.) al interior celular y facilita la salida de los productos tóxicos o de desecho.²¹⁴ Otra de las funciones principales de esta membrana es mantener el equilibrio y regular las concentraciones iónicas intracelulares, lo que conlleva el transporte de dichos iones a través de la membrana para regular su concentración tanto en el ambiente extracelular como en el intracelular. El transporte de estos iones o moléculas puede llevarse a cabo de forma pasiva o de forma activa.²¹⁵ Los métodos de transporte pasivo incluyen la difusión simple de las moléculas a través de la membrana y el uso de canales iónicos o transportadores (difusión facilitada). El transporte activo de sustancias se caracteriza por el consumo de energía, habitualmente en forma de ATP. La **figura 5.1** recoge los diferentes mecanismos de transporte empleados por las células para transportar sustancias entre el interior y el exterior celular.

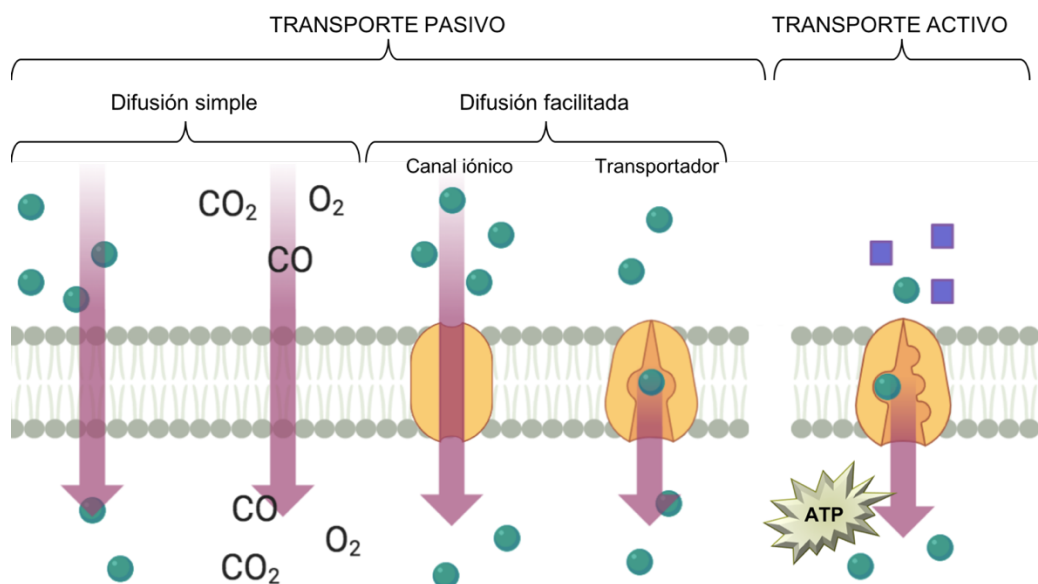


Figura 5.1. Sistemas de transporte utilizados por las células para incorporar moléculas, sales e iones a su interior, tanto de forma pasiva como activa.

Los precursores iónicos más comúnmente utilizados para la síntesis de NPs se encuentran en forma de sal. En concreto, uno de los mecanismos que utilizan las células

5. Encapsulación por reducción en atmósfera de CO

para incorporar sales en su interior es la difusión pasiva (las sales son capaces de atravesar la bicapa lipídica de la membrana plasmática y penetrar en el interior celular siguiendo un gradiente de concentración). Es razonable pensar que tanto la moléculas iónicas como los gases hidrofóbicos incluido el CO, podrían ser transportados al interior de los exosomas por simple difusión pasiva, usando el gradiente de concentración como fuerza impulsora a través de la membrana fosfolipídica. Este transporte vendría descrito por la Ley de Fick particularizada para una membrana, la cual establece que la velocidad de difusión de una sustancia o molécula a través de una membrana es directamente proporcional a una constante (denominada coeficiente de difusión, K), a la superficie de transporte y al gradiente de concentración a ambos lados de la membrana, e inversamente proporcional al espesor de la membrana.^{216,217} Por su parte, el coeficiente de difusión de una determinada molécula o sustancia a través de una membrana depende principalmente del su peso molecular, de su grado de ionización así como de su liposolubilidad.

Considerando las características de la membrana exosomal y su permeabilidad a estos gases hidrofóbicos y a diferentes sales, iones y moléculas, se planteó la posibilidad de generar directamente las NPs metálicas en el interior de las vesículas, convirtiendo al exosoma un nanoreactor donde se verificaría la reducción de los precursores metálicos.

Aunque la síntesis de nanomateriales metálicos en presencia de un precursor iónico y de un gas reductor ha sido ya descrita, hasta ahora ningún trabajo ha indicado el uso de esta estrategia para generar partículas en el interior de exosomas. En concreto, en esta Tesis Doctoral se han generado PdNSs, AuNPs y PtNPs en el interior de estas vesículas extracelulares derivadas de diferentes líneas celulares. En el caso de los exosomas cargados con PdNSs (Pd-Exos), el objetivo principal fue utilizar sus propiedades catalíticas. De esta forma, los exosomas cargados con las PdNSs podrían servir como herramientas catalíticas bioortogonales para el tratamiento del cáncer. Por su parte, los exosomas cargados con las AuNPs (Au-Exos) podrían actuar como potenciales agentes de imagen para delimitar zonas tumorales (Pt-Exos). Finalmente, en el caso del platino, se pretendió explotar las propiedades antitumorales de las PtNPs de menos de 5 nm, usando los exosomas como vehículos citotóxicos antitumorales.

En este capítulo se detalla la generación, la caracterización y la estabilidad de estos vectores híbridos y en los capítulos posteriores se estudiará su potencial terapéutico.

5.2. Experimental

5.2.1. Purificación de exosomas de cultivos celulares

Los exosomas empleados en este capítulo se purificaron por ultracentrifugación a partir de cultivos celulares tal y como se ha descrito en el capítulo 3. En función de la aplicación final de cada uno de estos vectores cargados con las diversas nanoestructuras metálicas, se escogieron exosomas derivados de diferentes líneas celulares (hpMSCs, células A549, células B16-F1, células B16-F10 y células U251-MG), cuya caracterización se muestra en la sección de resultados.

5.2.2. Incubación de los exosomas con los precursores metálicos

Inmediatamente después del aislamiento de los exosomas por ultracentrifugación, se realizó un ensayo BCA para obtener su concentración a partir de la cantidad de proteína total (ver capítulo 3). Una vez estimada la concentración de los exosomas, diferentes precursores iónicos se pusieron en contacto con estas vesículas extracelulares. En concreto:

- Para generar las PdNSs se empleó el cloropaldato de potasio (II), (K_2PdCl_4 , $M_m=326,43$ g/mol).
- En el caso de las AuNPs se utilizó ácido cloroáurico ($HAuCl_4$, $M_m=339,79$ g/mol).
- Las PtNPs se sintetizaron empleando ácido cloroplatínico (H_2PtCl_6 , 8 % pureza en H_2O , $M_m=409,81$ g/mol).

Los precursores iónicos se incubaron con los exosomas permitiendo su incorporación al interior de los mismos por difusión, a temperatura ambiente y sin agitación durante 12 h. La diferencia de concentración de la sal precursora fuera y dentro del exosoma actuará como fuerza impulsora trasladando estos iones al interior de los mismos hasta alcanzar el equilibrio. La estrategia empleada para incubar los precursores de los diferentes metales con los exosomas de todas las líneas celulares usadas fue idéntica, aunque, con el objetivo de obtener la carga deseada, la concentración de dichos precursores metálicos pudo variar para cada tipo de exosomas y cada clase de precursor.

En concreto, 30 μ g de exosomas se dispersaron en 30 mL de PBS conteniendo el precursor metálico a diferentes concentraciones (desde 0,6 a 0,006 mM). Esta mezcla de exosomas y precursores iónicos se mantuvo en contacto durante 12 h a temperatura ambiente y sin agitación magnética para minimizar la agregación de las vesículas. Pasado este tiempo, la mezcla se ultracentrifugó a 100000 g durante 2 h a 4 °C para

5. Encapsulación por reducción en atmósfera de CO

eliminar el exceso de iones no internalizados en los exosomas, descartándose el sobrenadante del producto ultracentrifugado. Finalmente, el precipitado de exosomas conteniendo los iones metálicos en su interior, se resuspendió en 1 mL de PBS para ser posteriormente tratado con el CO y así formar las nanoestructuras metálicas en su interior. El esquema de la **figura 5.2** ilustra la carga de los precursores iónicos y del gas reductor en el interior del exosoma, convirtiéndolo en un nanoreactor donde generar las diferentes nanoestructuras mostradas en este capítulo.

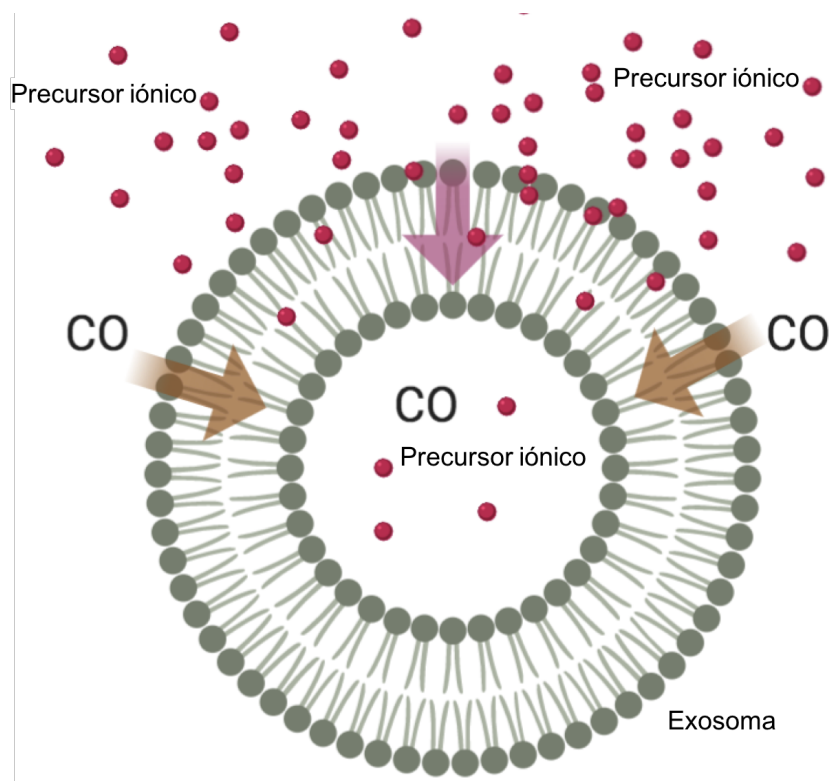


Figura 5.2. Exosoma como nanoreactor. Incorporación de sales precursoras y del CO (gas reductor).

5.2.3. Generación de los nanomateriales por reducción con CO

Es importante destacar que el monóxido de carbono está catalogado como un gas altamente inflamable, incoloro, inodoro, insípido y extremadamente tóxico debido a su capacidad de unión a la mioglobina y a la citocromo oxidasa mitocondrial.²¹⁸ Este gas se combina muy fácilmente con la hemoglobina formando carboxihemoglobina, pudiendo causar estrés hipóxico debido a una reducción del transporte de oxígeno en sangre.²¹⁹ En concordancia con lo establecido por el Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (INSST), el valor límite ambiental de exposición de corta duración (VLA-EC) en un promedio de tiempo de 8 horas es de 20 ppm.²²⁰ Por ello, la manipulación del CO se realizó con las medidas de seguridad adecuadas y en presencia

5. Encapsulación por reducción en atmósfera de CO

de un detector de CO con una alarma configurada con los límites de CO permitidos. La **figura 5.3** ilustra el sistema experimental utilizado.

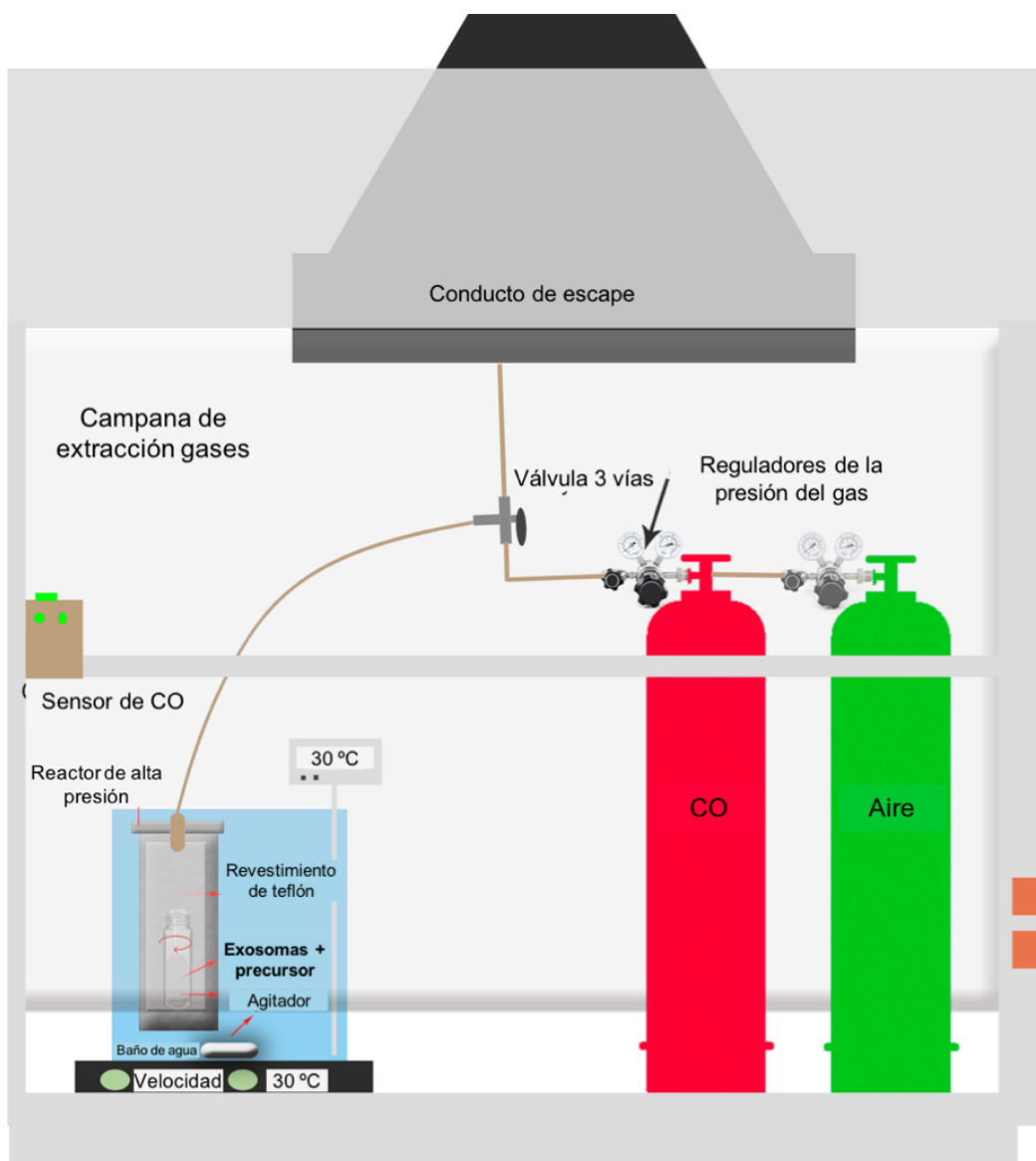


Figura 5.3. Ilustración de la campana de extracción de gases conteniendo el autoclave recubierto con teflón en cuyo interior se encuentra el vial con los exosomas. En el esquema también se muestran las botellas de CO y aire conectadas a la llave de tres vías para llevar a cabo la reducción de los precursores iónicos localizados en el interior de los exosomas.

Para llevar a cabo la reacción, el vial con la disolución exosomas cargados con los iones metálicos en su interior (en 1 mL de PBS) se introdujo en un reactor de alta presión (autoclave) con recubrimiento de teflón. Se incorporó poco a poco CO como agente reductor a una presión de 6 bar mediante una válvula de tres vías en la tapa de teflón del autoclave. Para llevar a cabo la síntesis de las nanoestructuras, el autoclave se introdujo en un baño de agua a 30 °C con agitación para garantizar una temperatura homogénea en el tanque. Una vez alcanzada una presión de CO de 6 bar, el reactor se

5. Encapsulación por reducción en atmósfera de CO

mantuvo durante 40 minutos en esta atmósfera reductora a 30 °C para llevar a cabo la conversión de los iones metálicos. Pasado este tiempo, se introdujo aire en el interior del reactor para desorber el CO con el doble objetivo de parar la reacción química y garantizar una manipulación segura del reactor al ser abierto para extraer el vial conteniendo los exosomas cargados con NPs.

5.2.4. Caracterización de los exosomas con las nanoestructuras en su interior

Tras la síntesis de las correspondientes NPs, los exosomas cargados se caracterizaron por una batería de métodos físicoquímicos y biológicos con el objetivo de verificar su correcta morfología y funcionalidad: microscopía electrónica (TEM convencional, STEM-HAADF, análisis de la composición química por EDX y crioTEM), WB, espectroscopía UV-VIS, potencial zeta, NTA, XPS, MP-AES e ICP-MS. Los métodos experimentales utilizados para caracterizar los exosomas por estas técnicas, se encuentran ampliamente detalladas en el capítulo 3.

5.2.5. Evaluación de la estabilidad de los exosomas

Se midió el diámetro hidrodinámico de los exosomas control y de los exosomas cargados con las nanoestructuras el día de su síntesis, así como 24 y 72 horas después (por la técnica de NTA). Además, a los mismos tiempos se evaluó la carga superficial (potencial zeta) de las vesículas cargadas con las nanoestructuras. Esta carga superficial se comparó con la de exosomas control no tratados con CO y con la de exosomas control tratados con CO en ausencia de precursor, con el fin de verificar si el CO en ausencia de precursores iónicos afectaba a la carga de las vesículas.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Caracterización de los Pd-Exos

Con ayuda de la microscopía electrónica, en primer lugar, se optimizó la cantidad de Pd en el interior de exosomas derivados de células B16-F1 (Exos^{B16-F1}). Para ello, los Exos^{B16-F1} se incubaron con disoluciones de precursor K₂PdCl₄ 0,03 y 0,06 mM antes de someterse a la atmósfera reductora de CO de alta presión para evaluar la presencia de nanoestructuras de Pd en su interior, así como su morfología y tamaño.

La **figura 5.4.A** muestra imágenes TEM de Exos^{B16-F1} control, y de exosomas incubados con disoluciones 0,03 y 0,06 mM K₂PdCl₄ antes y después de someterse al tratamiento con CO. Los histogramas de distribución de tamaños de la **figura 5.4.B** demuestran que ni la aplicación de CO durante 40 minutos ni la presencia final de las

5. Encapsulación por reducción en atmósfera de CO

nanoestructuras de Pd afectaron al tamaño de los exosomas ni a su morfología redondeada (los diámetros obtenidos para los exosomas control, para los incubados con K_2PdCl_4 0,03 mM y con K_2PdCl_4 0,06 mM fueron de $80,2 \pm 12,9$ nm; $84,6 \pm 17,3$ nm y $85,5 \pm 17,7$ nm, respectivamente).

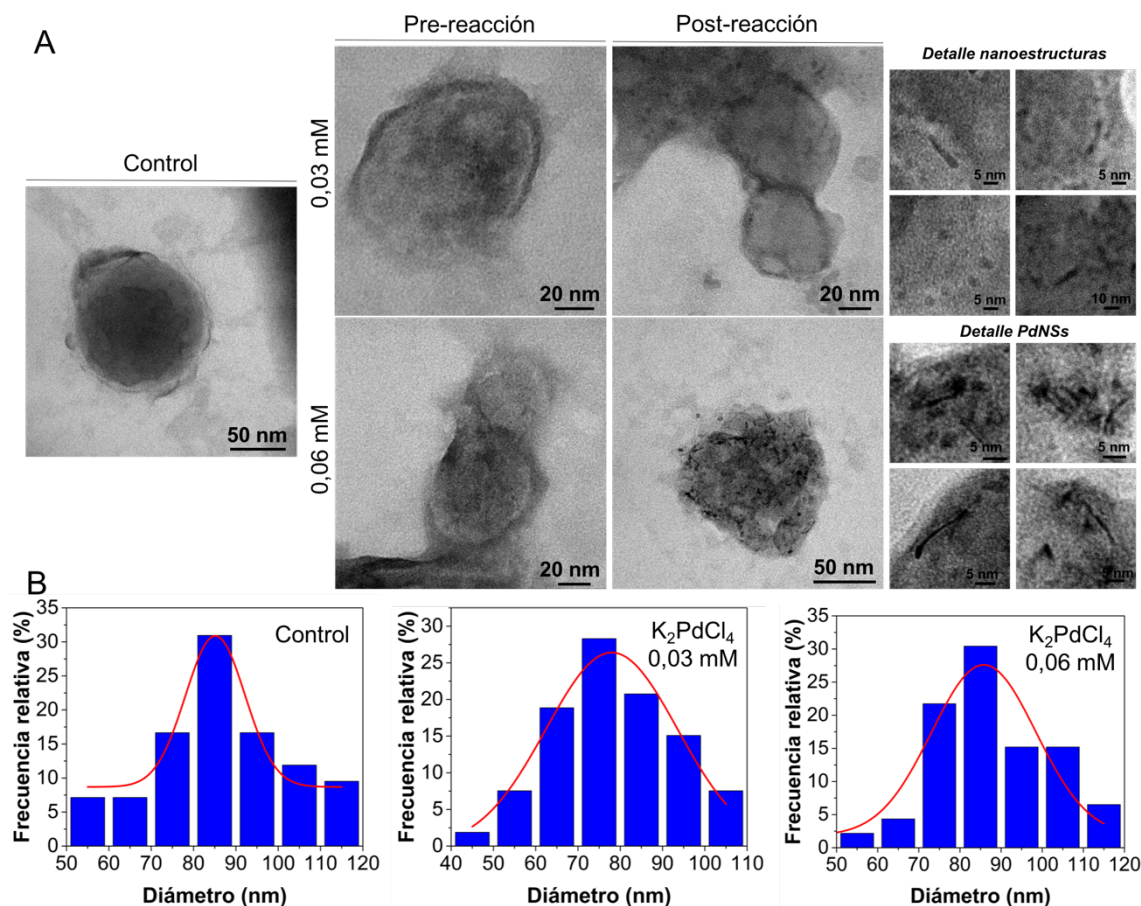


Figura 5.4. Fotografías de TEM de Exos^{B16-F1} sin tratamiento (control), y antes y después del tratamiento con CO, incubados con diferentes concentraciones de precursor (0,03 y 0,06 mM). Además, se recoge el detalle de las nanoestructuras de Pd formadas en su interior. B) Histogramas de distribución de tamaños de los tres tipos de exosomas.

Como puede observarse en las imágenes de la derecha de la **figura 5.4.A**, tras el tratamiento con CO durante 40 minutos, en los exosomas incubados con ambas concentraciones de K_2PdCl_4 se aprecian nanoláminas (NSs) y/o NPs de Pd (correspondientes con la aparición de Pd^0 a partir de Pd^{2+} en presencia de CO). Como cabía esperar, se observa mayor cantidad de nanoestructuras de Pd en el interior de los exosomas incubados con la disolución de mayor concentración de precursor. En el caso de exosomas incubados con K_2PdCl_4 0,03 mM se observaron escasas nanoestructuras de Pd, debido a la limitada cantidad de precursor en el interior de los exosomas. Además, en el caso de los exosomas incubados con 0,06 mM de K_2PdCl_4 se formaron

5. Encapsulación por reducción en atmósfera de CO

mayoritariamente NSs, mientras a una concentración de 0,03 mM se generaron principalmente NPs.

Considerando estos resultados se estableció 0,06 mM como la concentración de precursor óptima. La alta presión de CO en el autoclave aseguró una solubilidad suficiente del gas en el medio de reacción, necesaria para controlar la forma de las nanoestructuras de Pd gracias a su quimisorción selectiva que induce el crecimiento anisotrópico en forma de lámina.^{221,222} La cantidad de Pd en el interior exosomal se cuantificó por MP-AES y se refirió a la masa de exosomas (medida por la cantidad de proteína), obteniéndose un valor de 0,83 μg de Pd/ μg de exosoma cuando se incubaron a una concentración de 0,06 mM.

Para ensayar el protocolo en otra línea celular, y también con el objeto de evaluar la evolución con el tiempo de exposición al CO, las vesículas derivadas de una línea también de melanoma pero mucho más agresivo (B16-F10) se aislaron e incubaron con una disolución de K_2PdCl_4 0,06 mM durante 12 horas a temperatura ambiente, se ultracentrifugaron (para eliminar el exceso de precursor no internalizado) y finalmente se sometieron a una atmósfera de CO de 6 bar a 30 °C durante diferentes tiempos (2, 5 y 10 minutos). La **figura 5.5** muestra como pasados dos minutos, los primeros agregados de Pd^0 empezaban a formarse en el interior de los Exos^{B16-F10}. Probablemente, estas primeras formaciones de Pd^0 actúan como núcleo precursor a partir del cual van creciendo las NSs y las NPs de Pd tras 5 y 10 minutos.

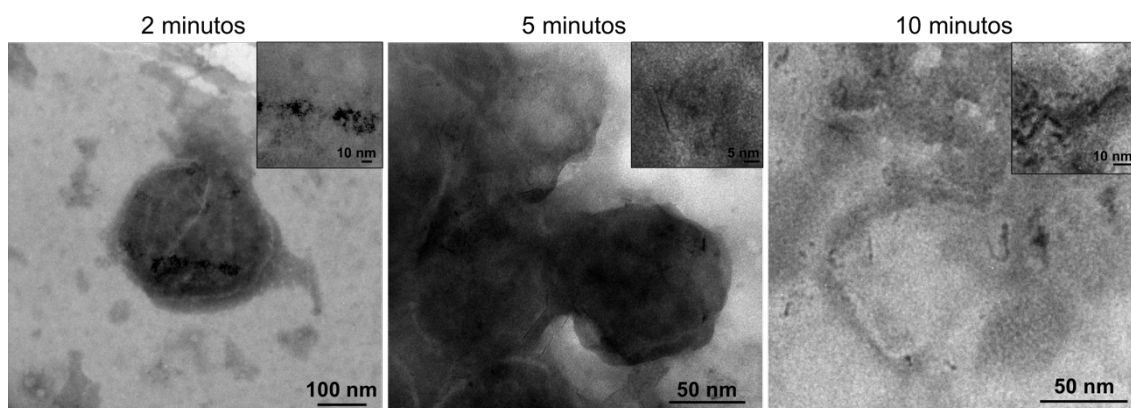


Figura 5.5. Fotografías de TEM de los exosomas derivados de células B16-F10 incubados con K_2PdCl_4 0,06 mM y expuestos a una atmósfera de CO durante 2, 5 y 10 minutos.

Comparado con los exosomas incubados con la misma cantidad de precursor, pero sometidos a 40 minutos de tratamiento con CO mostrados en la **figura 5.6.A**, puede claramente observarse que la cantidad de PdNSs presente en su interior aumentó significativamente al incrementar el tiempo de contacto con el gas. Estos resultados indican que, aunque tras 5 y 10 minutos de exposición al CO se pueden

5. Encapsulación por reducción en atmósfera de CO

observar las primeras PdNSs en el interior de estas vesículas, todavía queda gran cantidad de Pd en forma iónica sin reducir en el interior de las mismas. Por ello, se mantuvo un periodo de 40 minutos como tiempo de reacción adecuado para la generación de estas nanoestructuras en el interior de los exosomas.

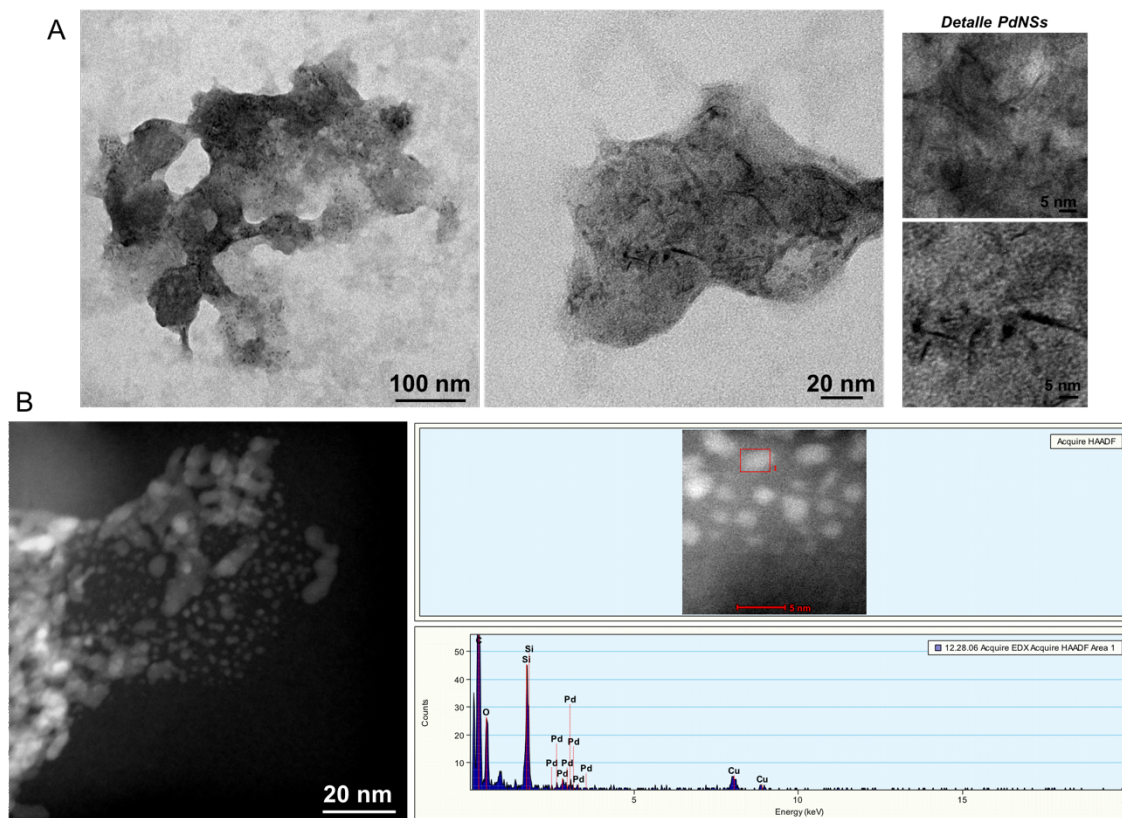


Figura 5.6. A) Fotografías de TEM de los exosomas derivados de células B16-F10 tras ser incubados con K_2PdCl_4 0,06 mM y expuestos durante 40 minutos a una atmósfera de CO. B) Análisis EDX de una zona de los exosomas cargados con las PdNSs.

La caracterización de estos exosomas por STEM nos permitió observar las nanoestructuras de Pd como elementos con un color más claro en el interior del exosoma (**figura 5.6.B**). Es importante mencionar que, en este caso, no es posible observar el exosoma puesto que la muestra no se recubrió con ningún agente de contraste con el fin de realizar una evaluación de la composición del material por análisis EDX. Estos resultados confirmaron que las nanoestructuras en el interior del exosoma están compuestas únicamente de Pd. También se observa la presencia de Si y Cu (provenientes de la rejilla utilizada para depositar la muestra y ser visualizada) y O (del medio ambiente).

Las PdNSs son especialmente interesantes ya que se conoce desde hace décadas que láminas ultrafinas de diferentes metales exhiben efectos cuánticos y una superficie que las proveen con propiedades físicas y químicas

5. Encapsulación por reducción en atmósfera de CO

extraordinarias.^{223,224,225,226} De hecho, se ha descrito el uso de CO para sintetizar PdNSs de menos de 10 capas atómicas con una largura de 20 a 160 nm exhibiendo una actividad electrocatalítica para la oxidación de ácido fórmico 2,5 veces más activa que otros catalizadores comerciales. También presentan respuesta plasmónica en el NIR.²²¹

Como ya se ha comentado, el empleo del CO como agente reductor es lo que permite el crecimiento de las PdNSs ultrafinas, actuando como elemento director del crecimiento de las láminas gracias a su adsorción preferencial sobre la cara (111)²²⁶ que parece tener un papel más importante que los compuestos tensoactivos, cuya influencia también se ha sugerido.^{227,228} Además, los ensayos de FTIR desarrollados en el trabajo de Huang *y cols.*,²²⁶ indicaron que las PdNSs se forman en etapas muy tempranas de la reacción, corroborando los resultados mostrados en la **figura 5.6**, en la cual se observó que tras 5 minutos de exposición al CO, ya pueden observarse PdNSs. Posteriormente, la longitud de las NSs se va alargando a lo largo del tiempo, hasta que se agota el precursor iónico sin modificar el espesor de las mismas (2 nm). Sin embargo, cuando la cantidad de precursor iónico es limitada, se forman los primeros sitios de nucleación en el plano basal {111} pero al no haber iones Pd²⁺ disponibles para reducirse a Pd⁰ y crear las NSs a lo largo de este plano (**figura 5.4**), se forman preferentemente NPs en lugar de NSs. Como muestran nuestros resultados experimentales, 40 minutos de tratamiento con CO y una concentración de precursor K₂PdCl₄ de 0,06 mM son condiciones adecuadas para obtener PdNSs en el interior de los exosomas.

Para una validación adicional en otro tipo de exosomas se eligieron los derivados de células de cáncer de pulmón A549 (Exos^{A549}) ya que éste es responsable del mayor número de muertes relacionadas con cáncer en hombres y el segundo en mujeres tras el cáncer de mama (*World Cancer Report 2020*). Aproximadamente el 80 % de los tumores pulmonares, se corresponden con carcinomas de células no pequeñas.²²⁹ La línea celular A549 ha sido ampliamente estudiada desde hace más de 40 años como modelo para el estudio de cáncer de pulmón y para el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas.^{230,231,232,233} Los exosomas derivados de células A549 se aislaron y cargaron con las PdNSs siguiendo los procedimientos indicados para ser utilizados como vectores terapéuticos selectivos en el tratamiento de cáncer por catálisis bioortogonal *in vitro* (resultados mostrados en capítulos posteriores).

Los exosomas derivados de células A549 cargados con las PdNSs (Pd-Exos^{A549}) se caracterizaron por TEM, STEM y EDX; además en este caso la morfología, funcionalidad y estructura de estas vesículas se estudió por crioTEM, STEM-HAADF de alta resolución, ICP-MS, MP-AES, XPS, potencial zeta, NTA y WB.

5. Encapsulación por reducción en atmósfera de CO

Las fotografías de TEM recogidas en la **figura 5.7** muestran la presencia de vesículas redondeadas con un diámetro medio entre 100 y 140 nm de diámetro, tanto para los Exos^{A549} como para los Pd-Exos^{A549}. Es decir, como en casos anteriores, el tamaño y la morfología de estas vesículas no se veían afectados por la presencia de las PdNSs en su interior. El análisis EDX confirmó que las nanoestructuras con forma laminar presentes en el interior de estas vesículas estaban constituidas por Pd. Es importante destacar que la generación de Pd fue homogénea en todas las vesículas, lo que contrasta con los métodos convencionales de carga pasiva o activa y de carga por captación natural por las células parentales que mostraban una heterogeneidad mayor.

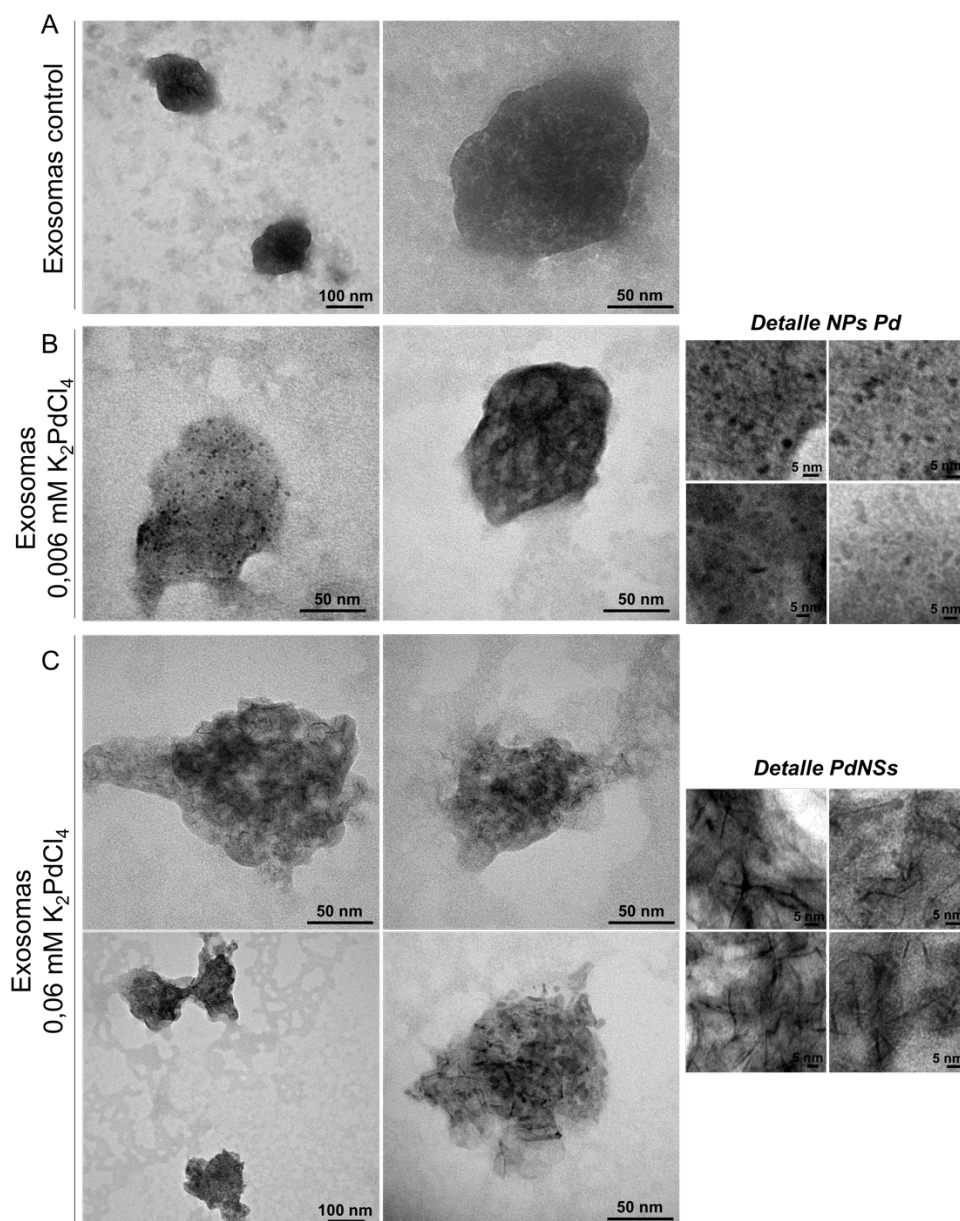


Figura 5.7. Fotografías de TEM de exosomas derivados de células A549. A) Exosomas control (sin tratamiento). B) Exosomas incubados con K_2PdCl_4 0,006 mM y expuestos durante 40 minutos a una atmósfera de CO. C) Exosomas incubados con K_2PdCl_4 0,06 mM y expuestos durante 40 minutos a una atmósfera de CO.

5. Encapsulación por reducción en atmósfera de CO

También se hizo uso de crioTEM para visualizar la estructura esférica nativa de estos exosomas sin necesidad de añadir agente de contraste. Las imágenes muestran que, aunque las PdNSs estaban distribuidas en todo el interior de los exosomas, gran parte de las mismas se encontraban localizadas cercanas a la membrana exosomal (**figura 5.8**).

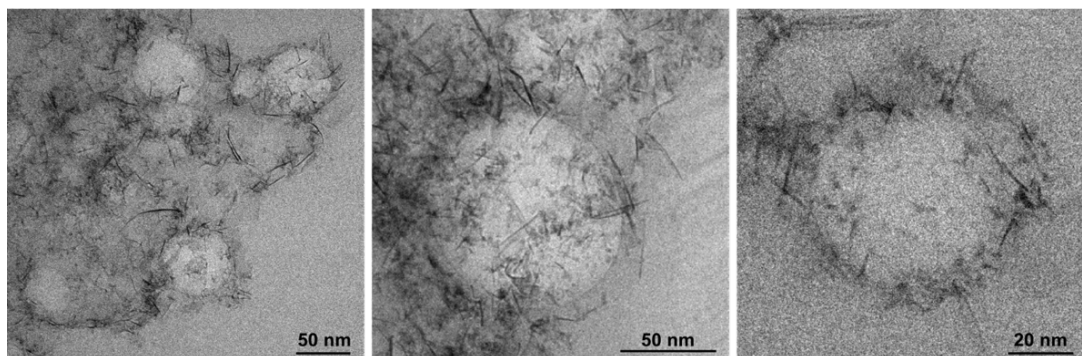


Figura 5.8. Fotografías de crioTEM de exosomas derivados de células A549 incubados con K_2PdCl_4 0,06 mM y expuestos durante 40 minutos a una atmósfera de CO.

La cristalinidad de las PdNSs en el interior de los exosomas se estudió mediante STEM-HAADF de alta resolución, revelando franjas reticulares con un espacio interplanar de 0,23 nm, que coinciden con las de superficies metálicas de Pd (111).²³⁴ Los espectros de la transformada de Fourier generados a partir de las imágenes de STEM-HAADF corroboran la estructura de estas PdNSs observadas (**figura 5.9**). Estos resultados concuerdan con la doble función del CO: en primer lugar como donante de electrones para reducir los átomos de Pd^{2+} a Pd^0 ; y en segundo lugar como agente estabilizante que restringe el crecimiento de las estructuras de Pd únicamente en forma de láminas debido a su absorción preferencial en el plano basal {111}.²²¹ Además, las imágenes de alta resolución revelaron que las nanoestructuras de Pd exhibían una configuración bidimensional orientada (NSs) con un espesor de aproximadamente 1,5 nm.

La cantidad de Pd en el interior de exosomas cargados con Pd se evaluó, tanto por MP-AES como por ICP-MS. Para ello, tal y como se ha comentado en el capítulo 3, las muestras se digirieron con agua regia y la masa de Pd determinada se refirió a la cantidad de proteína total de los exosomas calculada por el ensayo de BCA. La cuantificación mediante MP-AES reveló una media de 0,678 μg de Pd por μg de proteína de exosoma (0,678 μg de Pd/ μg proteína), una cantidad similar a la ya mostrada para los Pd-Exos^{B16-F1}. Estos resultados se corroboraron por ICP-MS (técnica con un mayor límite de detección) proporcionando una cantidad de Pd por cantidad de proteína de exosomas muy similar a la obtenida por MP-AES (0,64 μg de Pd/ μg

5. Encapsulación por reducción en atmósfera de CO

proteína). Las desviaciones estándar de las mediciones repetidas de una misma muestra fueron menores que el 4 % del valor obtenido. La similitud de resultados en cuanto a la encapsulación de Pd en el interior de exosomas derivados de diferentes tipos células demuestra la robustez y versatilidad de este método, siendo extrapolable, en principio a cualquier tipo de exosoma.

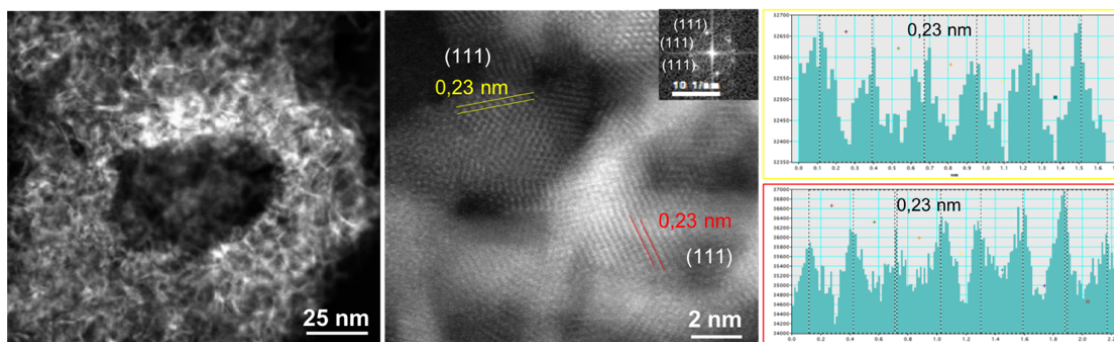


Figura 5.9. Imagen de STEM-HAADF de un exosoma cargado con las PdNSs y una imagen magnificada también de STEM-HAADF de alta resolución mostrando la alta cristalinidad de las nanoestructuras de Pd con una distancia interplanar de 0,23 nm que se corresponde con una superficie de Pd (111). En la imagen magnificada, el recuadro superior muestra el espectro de la transformada de Fourier generado.

Dado que las nanoestructuras de Pd también presentan efecto SPR, se analizó el patrón de absorbancia de los Pd-Exos^{A549} en la región del UV-VIS. El espectro reveló un pico máximo de absorbancia en la región del NIR, concretamente alrededor de 808 nm (**figura 5.10**). Este máximo de absorción es característico de estas estructuras de Pd en forma de NSs hexagonales y con un espesor de 1,5 nm.²²¹

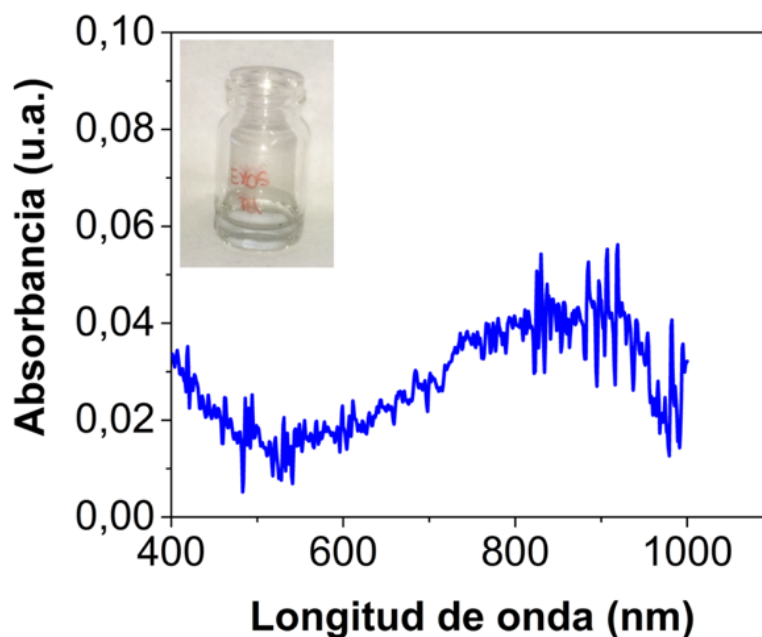


Figura 5.10. Espectro de absorción UV-VIS de los exosomas cargados con Pd, mostrando un pico de absorbancia máximo a aproximadamente a 810 nm.

5. Encapsulación por reducción en atmósfera de CO

La composición elemental de los exosomas (para determinar si la presencia de las PdNSs afectaba a sus biomoléculas) así como el entorno químico de los átomos de Pd presentes en su interior, se evaluaron por XPS (**figura 5.11** y **tabla 5.1**). En concreto, se pudo determinar que el 0,45 % de los átomos presentes en la muestra se correspondían a Pd. Además, este Pd se encontraba mayoritariamente en forma de Pd⁰ (60%) como se deduce a partir del área de los picos con una energía de enlace 335,2 (Pd 3d_{5/2}) y 340,2 (Pd 3d_{3/2}), correspondiente con el Pd completamente reducido.²³⁵ Los picos a mayor energía de enlace 337,2 (Pd 3d_{5/2}) y 342 (Pd 3d_{3/2}) indican mayor densidad electrónica, lo que podría deberse a la interacción del Pd con una molécula orgánica o más probablemente a la formación de óxido de Pd.^{236,237} El análisis del entorno atómico del N sugiere que la presencia del metal no modifica la composición de las proteínas, dado que el entorno de este átomo no se veía afectado por la presencia de Pd, siendo similar al de los exosomas control.

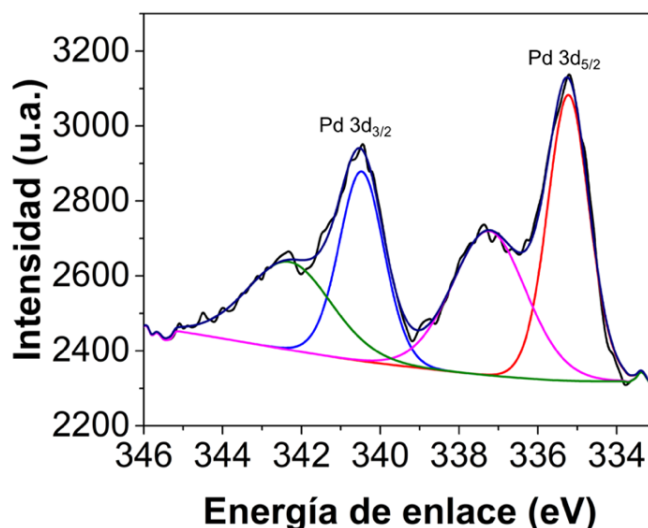


Figura 5.11. Análisis XPS del Pd 3d presente en los Pd-Exos^{A549}.

Tabla 5.1. En la fila superior se refleja la composición química (% atómico) de Exos^{A549} y Pd-Exos^{A549}. Debajo se muestra la distribución de estados de oxidación (Pd 3d) en exosomas cargados con Pd y de especies de N 1s en exosomas con y sin Pd.

Porcentaje atómico (%)						
	O 1s	N 1s	C 1s	S 2p	P 2p	Pd 3d
Exos ^{A549}	71,79	0.73	26,46	-	10,2	
Pd- Exos ^{A549}	61,83	0.66	35,10	-	1,97	0,45

Energía de enlace (eV) Porcentaje atómico	
Pd ⁰	PdO
335,2 60%	337,2 40%

Energía de enlace (eV) Porcentaje atómico			
	-NH ₂	R ₂ -NH	R ₃ -N
Exos ^{A549}	400,0 82%		402,5 18%
Pd-Exos ^{A549}	400 81%		402,4 19%

5. Encapsulación por reducción en atmósfera de CO

Para evaluar si la expresión de las proteínas presentes en la membrana de los exosomas se veía alterada durante la reacción con CO, se realizaron WB de exosomas derivados de células A549 tanto control y de exosomas cargados con Pd, y se analizó la expresión de las siguientes proteínas exosomales: CD9, CD63, CD81 y ALIX. Tal y como muestra la **figura 5.12**, se observaron niveles de expresión similares en exosomas control y en exosomas con PdNSs en su interior tras el tratamiento con CO. Estos resultados indican que ni la aplicación de la atmósfera de CO a alta presión ni la generación de las NSs *in situ* en el interior de los mismos afectan a la expresión de dichas proteínas características. Concretamente en el caso de la proteína ALIX, se observaron bandas en ambos tipos de exosomas con un peso de 95 kDa aproximadamente, tal y como está publicado.²³⁸ Para las tetraspaninas analizadas, se observaron bandas a 25-55, 26 y 25 kDa cuando la membrana incubó con anticuerpos específicos de CD63, CD81 y CD9, respectivamente.²³⁹

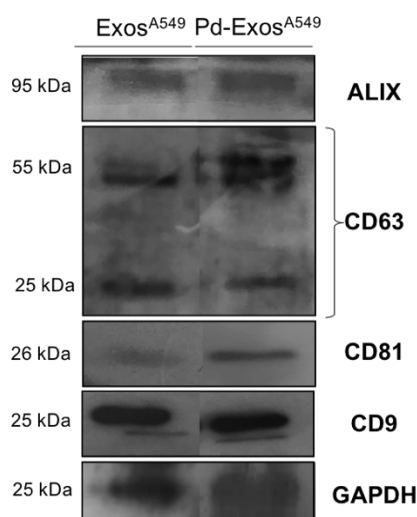


Figura 5.12. WB de las proteínas exosomales ALIX, CD63, CD81, CD9 en exosomas control y en exosomas con PdNSs en su interior. Además, se muestra la expresión de GAPDH como proteína control.

Con el fin de determinar si las PdNSs afectaban a la estructura terciaria y/o cuaternaria de las proteínas exosomales, se realizó un WB en condiciones nativas (no desnaturizantes). Como se observa en la **figura 5.13**, aunque las mismas bandas se obtuvieron en los exosomas control y en los exosomas tratados, la velocidad de migración fue significativamente diferente. Las proteínas de los exosomas tratados con Pd migraron más lentamente y ligeramente a la izquierda, lo cual es indicativo de un cambio sustancial en la carga y/o en la masa de estas proteínas exosomales. Este hecho puede atribuirse a la coordinación de las especies libres de Pd a las proteínas.²⁴⁰ Sin embargo, esta coordinación no afectaría a su expresión ni a su composición (de acuerdo con los resultados de los análisis de WB y de XPS previamente mostrados).

5. Encapsulación por reducción en atmósfera de CO

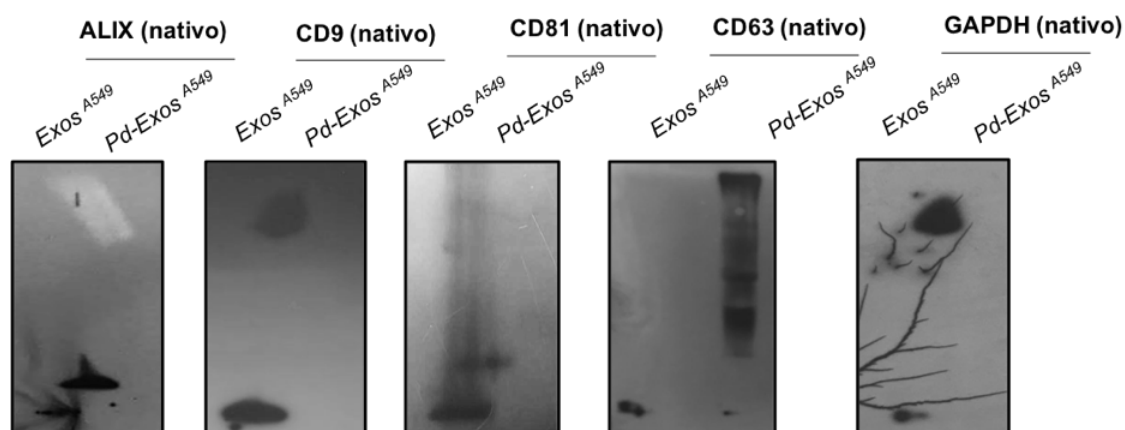


Figura 5.13. WB nativos (condiciones no desnaturalizantes) de las proteínas exosomales ALIX, CD63, CD81, CD9 en los exosomas control y de los exosomas con las NSs en su interior. Además, se muestra la expresión de GAPDH como proteína control.

Finalmente, se estudió también la cantidad de proteína total presente en exosomas antes y después de ser tratados con CO para descartar un posible efecto del gas en el contenido proteico total. Concentraciones de proteína de 101,45 y 102, 95 $\mu\text{g/mL}$ se obtuvieron para los exosomas control y los sometidos al tratamiento con CO, respectivamente. De manera similar, analizando el tamaño de los exosomas a lo largo del tiempo por NTA, no se observaron alteraciones significativas a lo largo del periodo estudiado (72 h), ver **figura 5.14** y **tabla 5.2**.

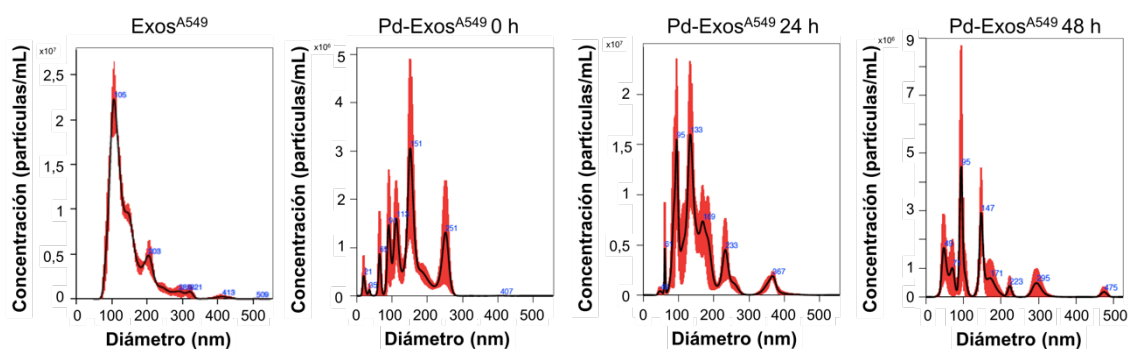


Figura 5.14. Gráficos de NTA de exosomas control y de Pd-Exos^{A549} a distintos tiempos.

Tabla 5.2. Evolución de los diámetros exosomales a partir de las gráficas mostradas en la **figura 5.14**.

	Diámetro medio	D10	D50	D90
Exos ^{A549} control	146,5 \pm 68 nm	92,6 \pm 3,2 nm	146,5 \pm 68 nm	216,4 \pm 3.0 nm
Pd-Exos ^{A549} 0 h	155,5 \pm 58,2 nm	85,6 \pm 12,7 nm	139,1 \pm 8,4 nm	215 \pm 19,5 nm
Pd-Exos ^{A549} 24 h	157,9 \pm 69,7 nm	98,5 \pm 8,0 nm	138,3 \pm 9,7 nm	233,8 \pm 14,2 nm
Pd-Exos ^{A549} 72 h	135,6 \pm 84,7 nm	65,2 \pm 15,6 nm	121,3 \pm 19,1 nm	200,8 \pm 47,9 nm

5. Encapsulación por reducción en atmósfera de CO

Del mismo modo, la carga superficial de los exosomas no se vio afectada por el tratamiento de CO en presencia del precursor de Pd y se mantuvo constante a lo largo de 72 h (**figura 5.15**).

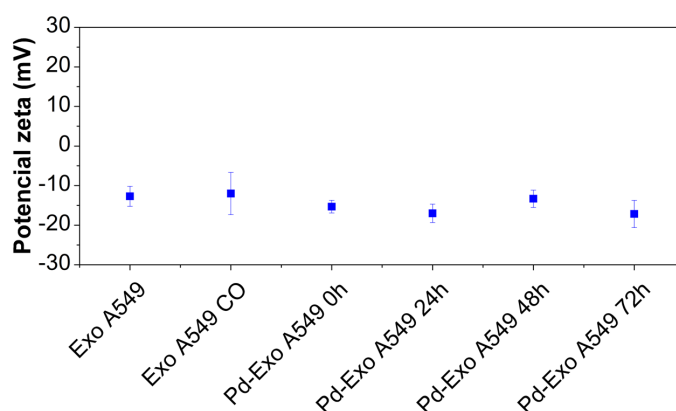


Figura 5.15. Análisis del potencial zeta de los exosomas derivados de células A549 sin tratar y tras ser expuestos a atmósfera de CO en ausencia o en presencia de precursor de Pd pasadas 24, 28 y 72 horas.

En resumen, los resultados mostrados en esta sección, demuestran que la síntesis PdNSs en el interior de exosomas es reproducible y no afecta a la integridad ni a la funcionalidad de los mismos. Además, este nuevo vector exosomal presenta suficiente estabilidad, lo que permite testar su potencial terapéutico como catalizador bioortogonal *in vitro*.

5.3.2. Caracterización de los Au-Exos

Con un método análogo (incubación con un precursor iónico y posterior tratamiento con CO) se ha realizado la síntesis de las AuNPs en el interior de exosomas. Al igual que con las nanoestructuras laminadas de Pd, nos servimos de la microscopía electrónica para optimizar el método con el precursor de HAuCl_4 , si bien, en este caso se emplearon únicamente exosomas derivados de células de melanoma, $\text{Exos}^{\text{B16-F1}}$ y $\text{Exos}^{\text{B16-F10}}$, con bajo y alto grado de malignidad, respectivamente.

Gran parte de los métodos publicados para la síntesis de AuNPs en fase líquida se basan en la reducción de ácido cloroáurico en presencia de algún agente reductor para formar una dispersión coloidal de partículas.^{241,242,243} Algunos de los agentes reductores más ampliamente utilizados son el citrato de sodio, el borohidruro de sodio o el formaldehído, permitiendo obtener NPs desde 16 hasta 147 nm de diámetro.^{244,245,246,247} Aunque con estas estrategias se obtienen NPs altamente monodispersas, son necesarias etapas de lavado posteriores para eliminar el exceso de agente reductor y, en numerosas ocasiones, las partículas deben funcionalizarse para prevenir su agregación y aumentar su estabilidad.²⁴⁸ Aunque el uso de CO y

5. Encapsulación por reducción en atmósfera de CO

HAuCl₄ para la síntesis de AuNPs ha sido ya publicado,^{209,212} este método todavía no ha sido empleado para sintetizar estas AuNPs directamente en el interior de exosomas.

En la **figura 5.16.A** se muestran fotografías de TEM de los Exos^{B16-F1} cargados con AuNPs (Au-Exos^{B16-F1}) incubados con 0,06 mM de HAuCl₄ y sometidos a la atmósfera de CO siguiendo el protocolo detallado anteriormente. Estas condiciones experimentales son exactamente las mismas que las optimizadas en la sección anterior para el caso del Pd. La **figura 5.16.B** muestra la distribución de tamaños de los Pd-Exos^{B16-F1}, tratándose de vesículas orgánicas redondeadas de $74,5 \pm 15,8$ nm de diámetro compatibles con exosomas. En su interior claramente pueden visualizarse esferas más oscuras de 2 a 10 nm de diámetro ($5,3 \pm 2,1$ nm de tamaño) correspondientes con AuNPs (**figura 5.16.C**). El análisis de la cantidad de oro llevado a cabo por MP-AES y su normalización por la cantidad de exosomas (expresado en proteína total obtenida por el ensayo de BCA) reveló una cantidad de 0,019 µg de Au/ µg de proteína total.

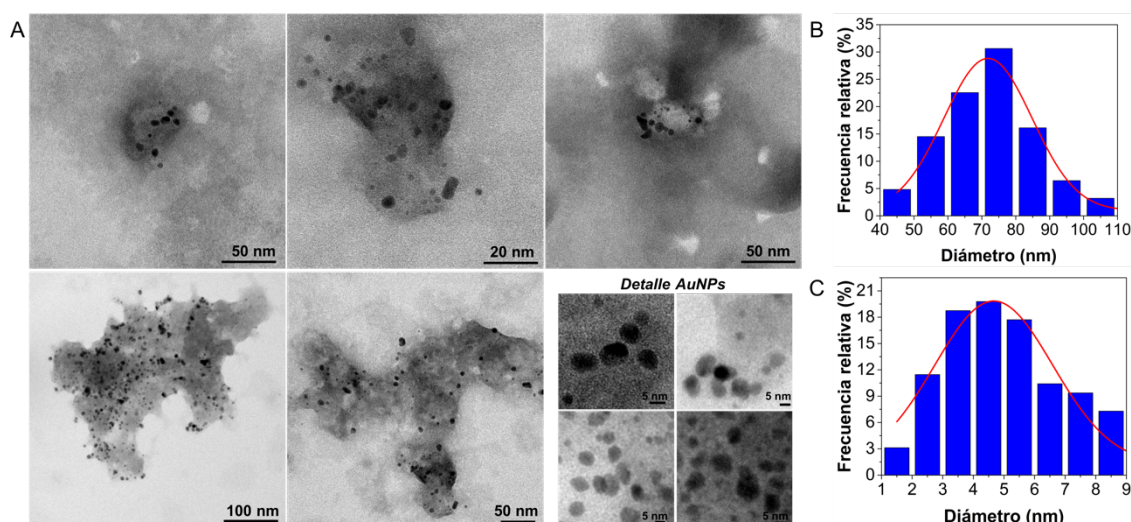


Figura 5.16. A) Micrografías TEM de los Au-Exos^{B16-F1} incubados con HAuCl₄ 0,06 mM y expuestos durante 40 minutos a una atmósfera de CO. B) Distribución de tamaños de los exosomas cargados con las partículas. C) Histograma de distribución de tamaños de las AuNPs presentes en el interior de los exosomas.

En esta síntesis, el primer paso es una rápida reducción del precursor de Au⁴⁺ a Au⁰, generándose los primeros núcleos de oro metálicos. Sobre estas semillas iniciales se produce el crecimiento hasta agotar la cantidad de Au⁴⁺ presente en el interior de los exosomas y formar las NPs de aproximadamente 5 nm. Al igual que en los Exos^{B16-F1}, los Exos^{B16-F10} se sometieron a esta metodología para cargar AuNPs en su interior. Las imágenes de microscopía electrónica (**figura 5.17**) muestran resultados análogos para los Exos^{B16-F10} cargados con AuNPs (Au-Exos^{B16-F10}): estructuras redondeadas de 80,1

5. Encapsulación por reducción en atmósfera de CO

$\pm 12,2$ nm de diámetro correspondientes con exosomas, cargados de AuNPs pseudoesféricas de 2 a 7 nm de diámetro en su interior ($5,1 \pm 2,2$ nm).

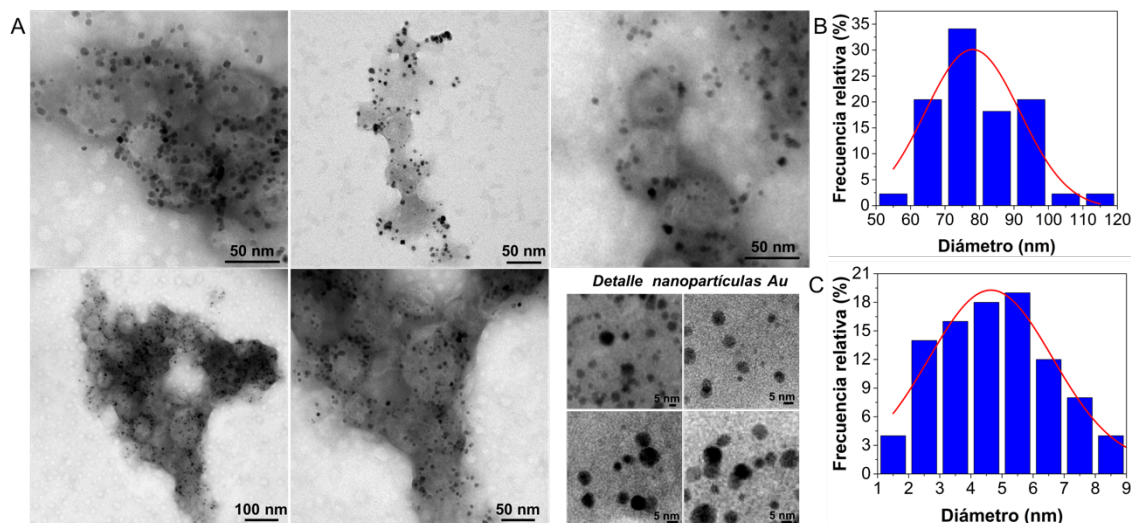


Figura 5.17. A) Micrográficas de TEM de los Au-Exos^{B16-F10} incubados con HAuCl₄ 0,06 mM y expuestos durante 40 minutos a una atmósfera de CO. B) Distribución de tamaños de los exosomas cargados con las partículas. C) Histograma de distribución de tamaños de las AuNPs presentes en el interior de los exosomas.

En el caso de los Au-Exos^{B16-F10}, éstos fueron también observados por microscopía electrónica de campo oscuro y se analizó su composición atómica por dispersión de rayos X. El análisis confirmó que las NPs localizadas en el interior de los exosomas estaban compuestas por oro (**figura 5.18**).

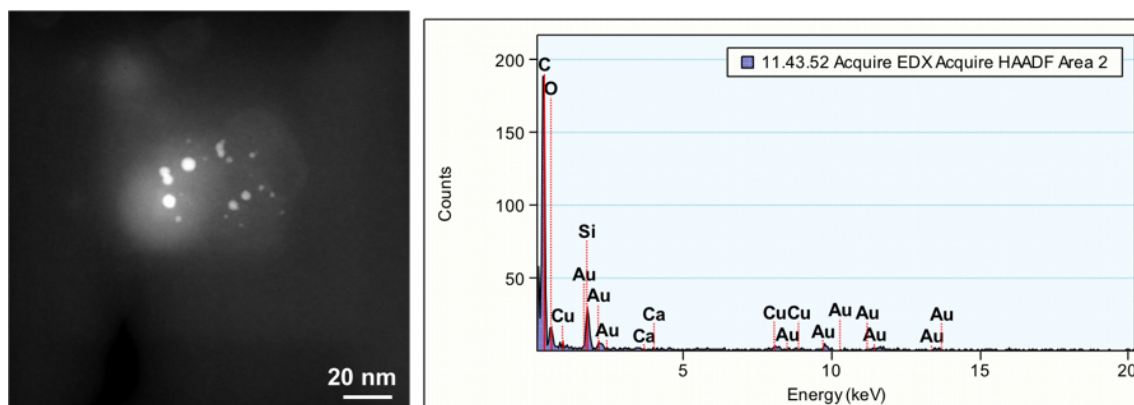


Figura 5.18. Análisis de EDX de las AuNPs localizadas en el interior de Au-Exos^{B16-F10}.

Puesto que las AuNPs presentan también efecto SPR, los Au-Exos^{B16-F10} fueron analizados por espectroscopía de absorción en el UV-VIS. En la **figura 5.19** puede observarse un pico máximo de absorción a 524 nm, característico de partículas de este material con una morfología esférica y un diámetro menor de 10 nm.²⁴⁹

5. Encapsulación por reducción en atmósfera de CO

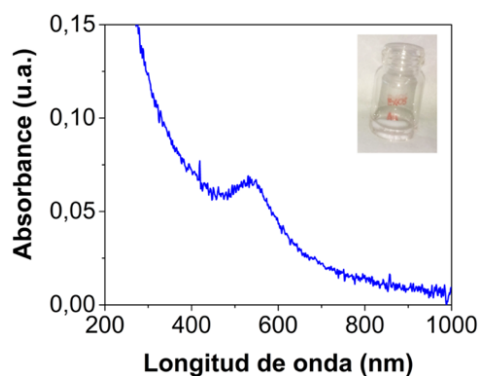


Figura 5.19. Espectro de absorción UV-VIS de los Au-Exos, mostrando un pico de plasmón absorbancia máximo a aproximadamente a 524 nm.

El siguiente objetivo fue intentar aumentar la carga de AuNPs en el interior de los exosomas. Para ello, se aumentó la cantidad de precursor incubado en la primera fase del protocolo incrementando su concentración hasta 0,12 mM y 0,6 mM (dos y diez veces más que la mostrada anteriormente, respectivamente). Como muestra la **figura 5.20**, todas las fracciones exosomales incubadas con las diferentes dosis de precursor de oro contenían NPs de este material en su interior y mayoritariamente acumuladas próximas a la membrana de estas vesículas extracelulares. Los exosomas estaban cargados con mayor número de AuNPs conforme se aumentaba la cantidad de precursor utilizada.

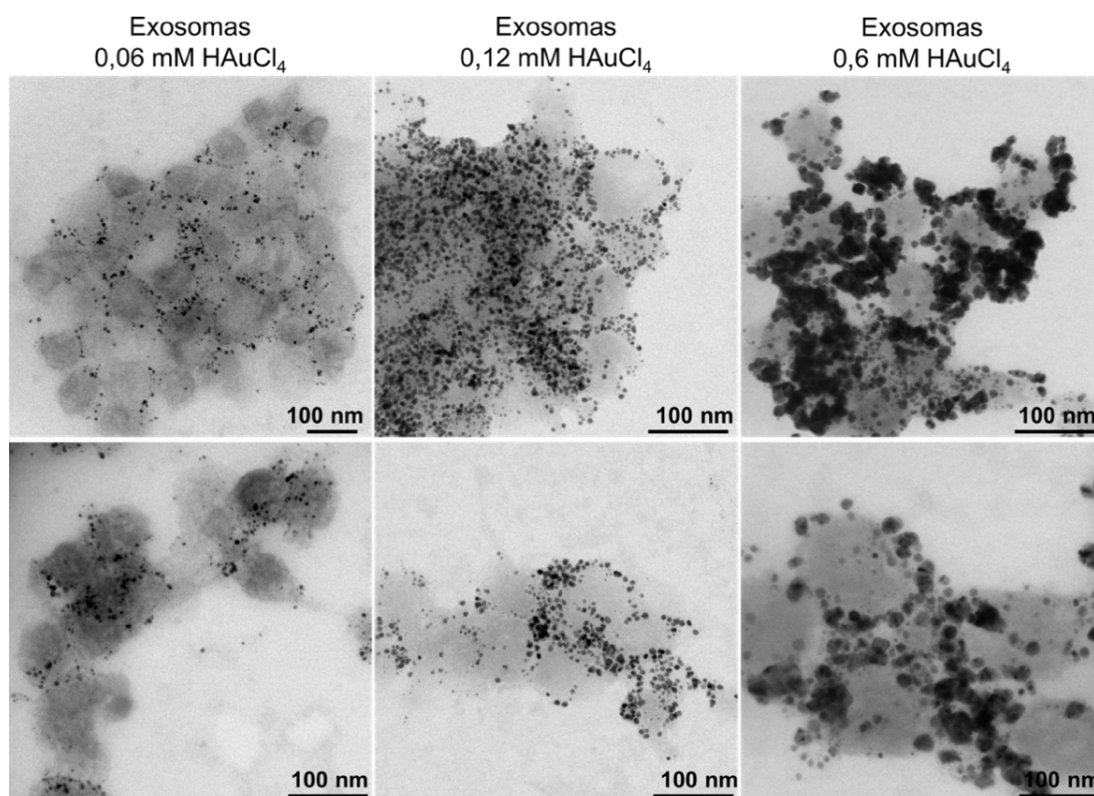


Figura 5.20. Micrografías TEM de Au-Exos^{B16-F10}. Exosomas incubados con HAuCl₄ 0,06 mM, 0,12 mM y 0,6 mM y expuestos durante 40 minutos a una atmósfera de CO.

5. Encapsulación por reducción en atmósfera de CO

Los histogramas de tamaños mostrados en la parte superior de la figura **5.21.A** relativos al diámetro de los Au-Exos^{B16-F10} permiten concluir que la presencia de un mayor número de partículas, así como de partículas significativamente más grandes no afectó al diámetro medio de los exosomas tratados ($87,21 \pm 13$ nm; $85,7 \pm 11,8$ nm y $88,5 \pm 13,5$ nm al ser incubados con 0,6, 0,12 o 0,06 mM HAuCl₄). Por otro lado, la distribución de tamaños obtenida a partir de las micrografías TEM confirma que no sólo aumentaba el número de partículas cargadas, sino que el tamaño de las mismas era también significativamente superior a medida que se aumentaba la cantidad de precursor (**figura 5.21.B**): $5,1 \pm 1,8$ nm (0,06 mM HAuCl₄), $6,9 \pm 2,5$ nm (0,12 mM HAuCl₄) y $17,2 \pm 7,6$ nm (0,6 mM HAuCl₄).

Estos resultados indican que la relación entre la velocidad de adición del agente reductor y la cantidad de precursor es clave en el proceso: con una baja concentración de precursor se obtienen partículas más pequeñas y monodispersas, sin embargo, al aumentar la cantidad de precursor, los procesos de crecimiento se solapan con nucleaciones sucesivas obteniéndose AuNPs más grandes, pero también con mayor grado de polidispersidad.

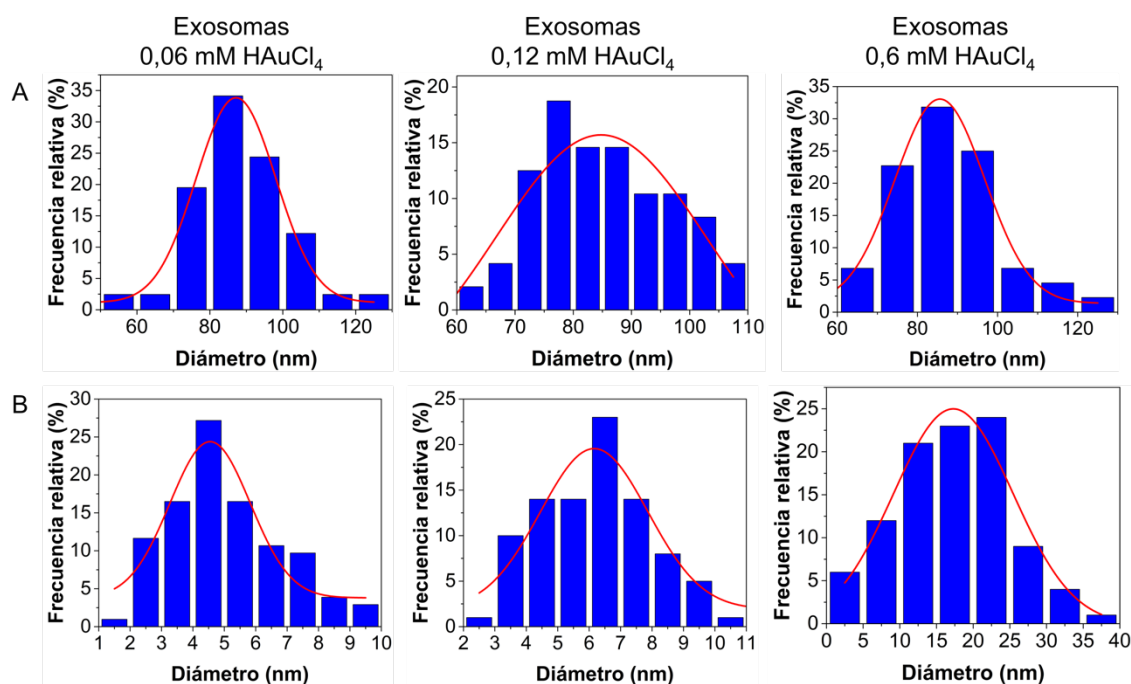


Figura 5.21. Histogramas de distribución de tamaños de: A) los exosomas y B) las AuNPs de las vesículas sometidas a los diferentes tratamientos mostrados en la **figura 5.20**.

Por último, se evaluó el efecto del tiempo de exposición al CO sobre el tamaño y morfología de los exosomas y sobre la cantidad y las dimensiones de las partículas generadas en su interior. Dos muestras de Exos^{B16-F1} se incubaron con 0,06 mM y 0,12 mM de precursor iónico y ultracentrifugaron siguiendo el protocolo habitual para eliminar

el precursor no internalizado. Posteriormente, se sometieron a atmósfera de CO durante 3 horas (en lugar de 40 minutos,) a la temperatura y la presión de CO habituales.

La **figura 5.22** muestra que los exosomas incubados con 0,06 y 0,12 mM de HAuCl_4 durante 3 h preservaban su morfología esférica y su tamaño característico. De hecho, los histogramas de distribución de tamaños de ambos tipos de exosomas muestran un diámetro medio de $83,26 \pm 15,59$ nm y $81,80 \pm 15$ nm, similares al de los exosomas control y al de los exosomas incubados con la misma cantidad de precursores, pero tratados con CO durante 40 minutos. El tamaño de las AuNPs localizadas en el interior de los exosomas tras 3 horas de exposición al CO fue de $4,7 \pm 1,2$ nm y $4,8 \pm 1,9$ nm para 0,06 y 0,12 mM de HAuCl_4 respectivamente (similares a los observados cuando el tratamiento con CO ocurría durante 40 minutos). Estos datos indican que el incremento en la exposición de los exosomas a la atmósfera de 6 atm de CO desde 40 minutos a 3 horas no aumentó significativamente ni el tamaño ni la cantidad de AuNPs presentes en su interior de exosomas, sugiriendo que tras 40 minutos no queda Au^{4+} disponible para ser reducido en el interior de los exosomas.

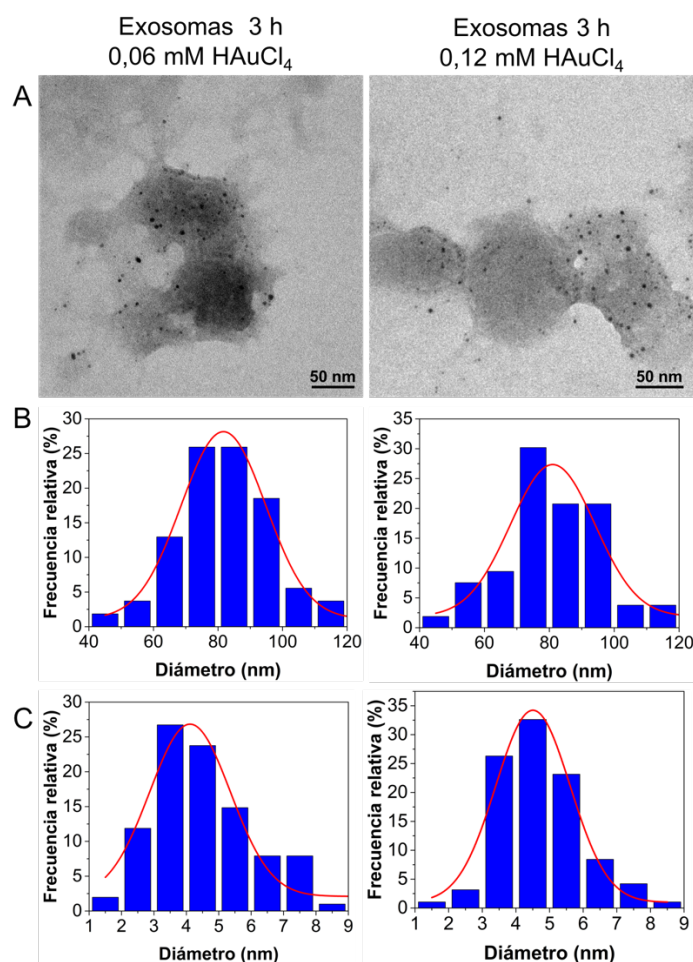


Figura 5.22. Micrografías TEM de Au-Exos^{B16-F10}. Exosomas incubados con HAuCl_4 0,06 mM y 0,12 mM y expuestos durante 3 horas a una atmósfera de CO. B) Distribución de tamaños de los exosomas y C) Distribución de tamaños de las AuNPs presentes en su interior.

5.3.3. Caracterización de los Pt-Exos

El procedimiento descrito se ha aplicado también a la síntesis de PtNPs en el interior de los exosomas a partir de ácido cloroplatínico (H_2PtCl_6) como agente precursor. Se utilizaron las mismas condiciones que para Pd y Au (0,06 mM de precursor y 40 minutos de exposición a CO) puesto que eran las condiciones óptimas para generar nanoestructuras monodispersas en el interior de los exosomas sin alterar su funcionalidad y morfología. Por tanto, el precursor de platino (0,06 mM) se puso en contacto con los exosomas durante 12 horas a temperatura ambiente sin agitación para lograr su internalización en las vesículas. Los exosomas con Pt^{4+} en su interior se expusieron a 6 bar de CO durante 40 minutos para reducir el Pt^{4+} iónico a nanopartículas de Pt. Para poder comparar los resultados con los casos de Pd y Au se utilizaron también los Exos^{B16-F10}.

La **figura 5.23** muestra exosomas derivados de esta línea celular incubados con el Pt y expuestos a la atmósfera de CO (Pt-Exos^{B16-F10}).

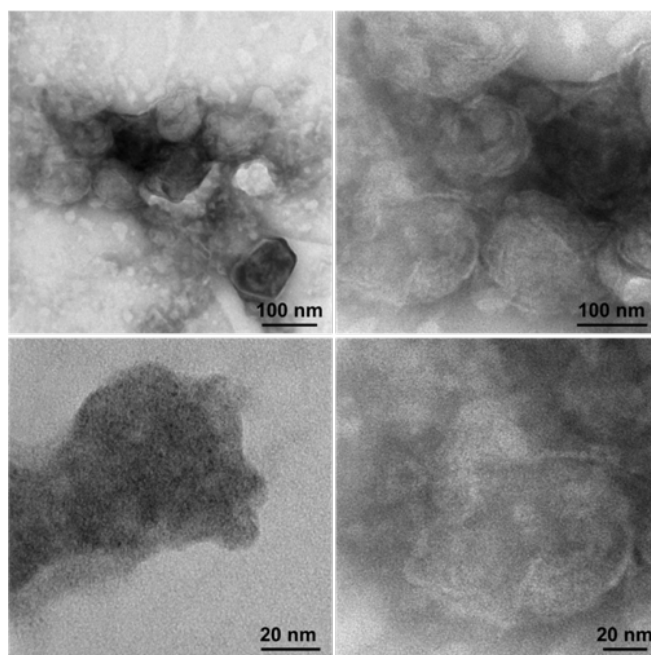


Figura 5.23. Micrografías TEM de Pt-Exos^{B16-F10}. Exosomas incubados con H_2PtCl_6 0,06 mM y tratados con una atmósfera de CO durante 40 minutos.

Al igual que con los otros metales, los exosomas mantenían intacta su estructura redondeada de aproximadamente 100 nm de diámetro e incluso en algunas ocasiones, pudo también evidenciarse su característica doble bicapa lipídica. Sin embargo, en este caso no era fácil apreciar directamente las partículas de Pt en su interior, debido a su pequeño tamaño. Estas vesículas se analizaron por microscopía electrónica de campo oscuro de alta resolución (**figura 5.24**). En este caso, se observaron los Pt-Exos^{B16-F10}

5. Encapsulación por reducción en atmósfera de CO

con NPs de aproximadamente 1 nm en su interior. El análisis por rayos X de la composición de estas partículas confirmó que se trataba efectivamente de Pt.

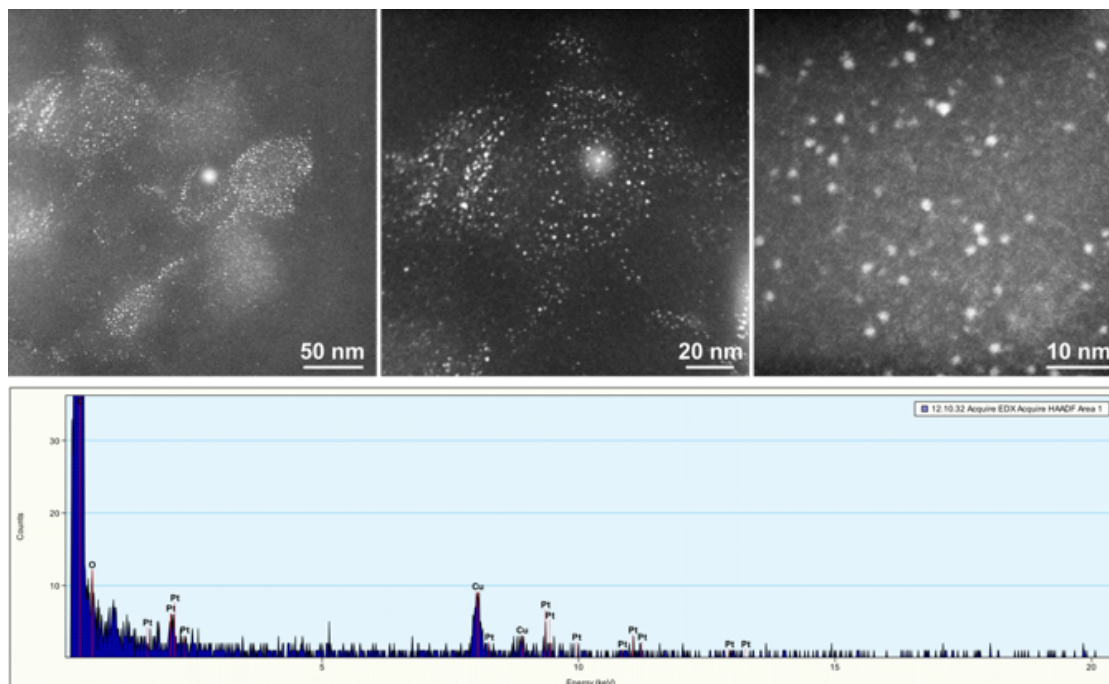


Figura 5.24. Visualización por STEM-HAADF y análisis de EDX de las nanopartículas de Pt localizadas en el interior de Pt-Exos^{B16-F10}.

La **figura 5.25.A** y la **figura 5.25.B** muestra los histogramas de distribución de tamaño de los exosomas y de las PtNPs contenidas en su interior, respectivamente. El diámetro de los Pt-Exos^{B16-F10} fue de $81,2 \pm 15,2$ nm, similar al obtenido para los exosomas control y los cargados con Pd y Au derivados de esta misma línea celular. Por su parte, las PtNPs exhibían un diámetro de $1,14 \pm 0,34$ nm, lo que justifica la necesidad de utilizar técnicas de microscopía electrónica de alta resolución para poder visualizarlas.

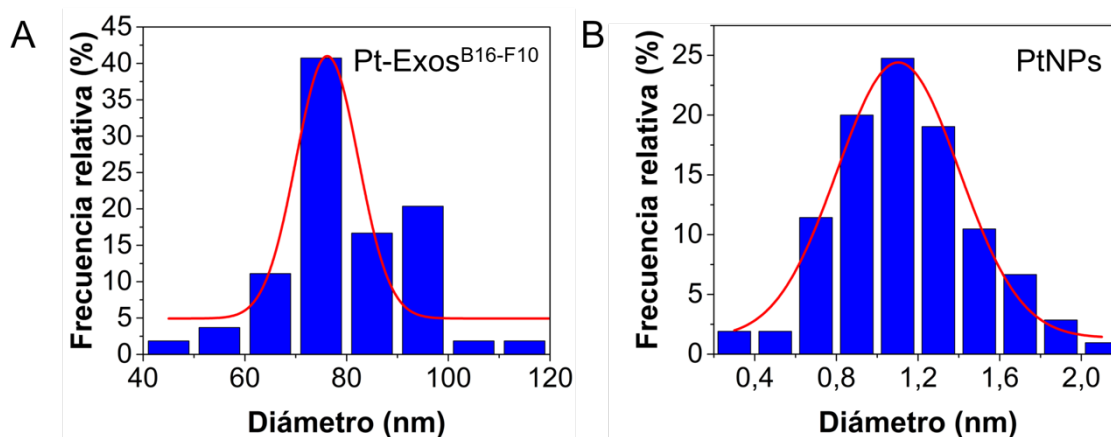


Figura 5.25. Histograma de distribución de tamaños de A) Pt-Exos^{B16-F10} y B) de las PtNPs encapsuladas.

5. Encapsulación por reducción en atmósfera de CO

Una vez demostrada la eficacia del procedimiento de síntesis de las PtNPs en el interior de Exos^{B16-F10}, esta misma estrategia fue empleada para cargar exosomas derivados de células U251-MG (Exos^{U251-MG}) y Exos^{hpMSCs} con PtNPs (Pt-Exos^{U251-MG} y Pt-Exos^{hpMSCs}). La **figura 5.26** muestra imágenes de TEM de exosomas derivados de ambas líneas celulares tanto en presencia como en ausencia de PtNPs. Una vez más, ni la morfología ni el tamaño de estos exosomas se vieron afectadas por el tratamiento con CO ni por la generación de las PtNPs en su interior.

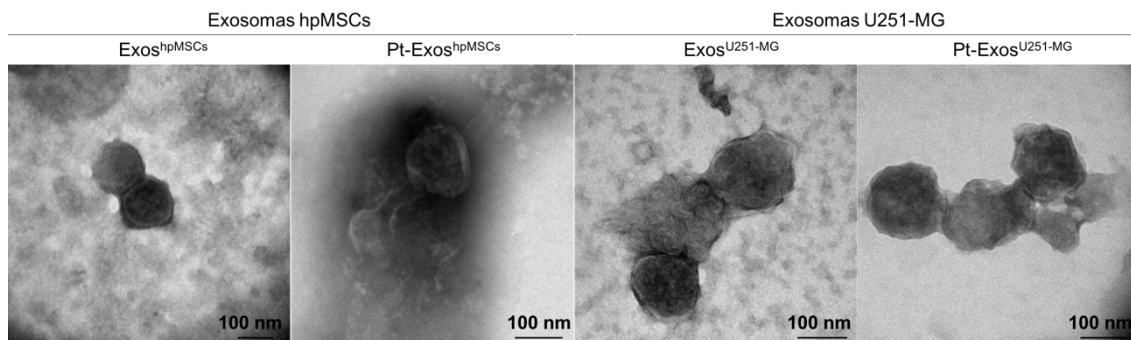


Figura 5.26. Fotografías de TEM de Exos^{U251-MG} y Exos^{hpMSCs} tanto en ausencia (control) como con las PtNPs en su interior tras su incubación con el precursor H_2PtCl_6 y el tratamiento con CO.

De nuevo, la microscopía electrónica de campo oscuro se utilizó para poder visualizar y diferenciar las partículas de Pt de entre 1 y 2 nm de diámetro en su interior (figura 5.27).

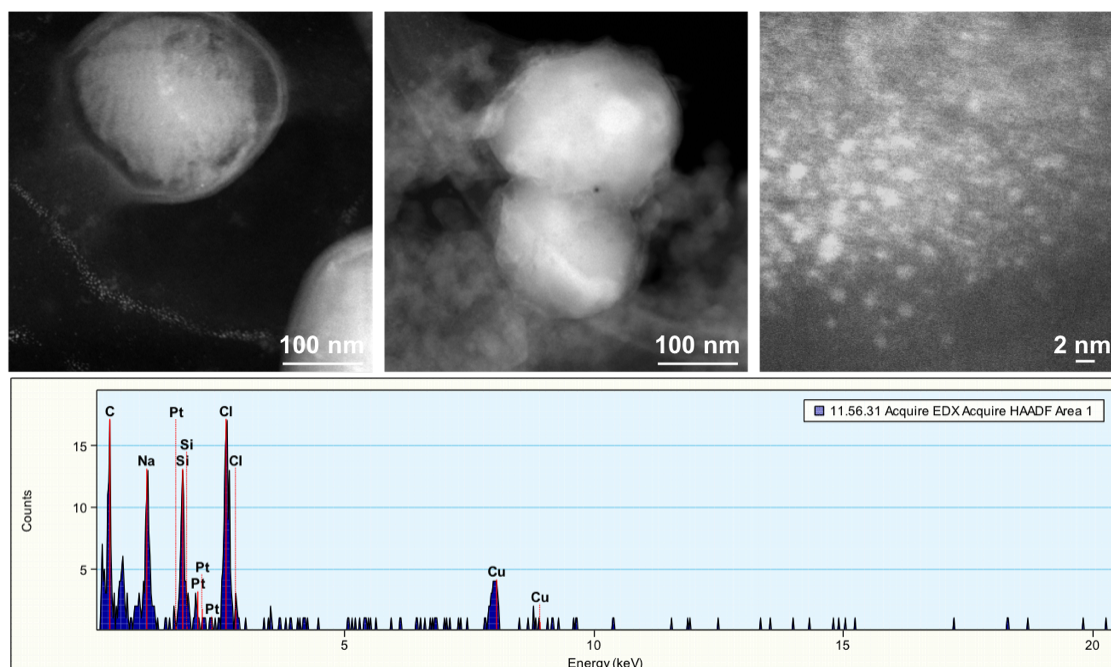


Figura 5.27. Visualización por STEM-HAADF y análisis de EDX de las nanopartículas de Pt localizadas en el interior de exosomas derivados de células hpMSCs.

5. Encapsulación por reducción en atmósfera de CO

En cuanto al potencial zeta de estos exosomas, se obtuvieron valores de $-20,64 \pm 2,90$ mV y $-25,99 \pm 2,62$ mV para los Pt-Exos^{U251-MG} y Pt-Exos^{hpMSCs}, respectivamente. Este potencial negativo es característico de la membrana exosomal, compuesta mayoritariamente por fosfolípidos. Por último, con el objetivo de aumentar la cantidad de PtNPs en el interior de los exosomas, se realizaron síntesis en las que se aumentó sucesivamente la concentración de la solución de precursor utilizada inicialmente en la incubación. Los resultados de MP-AES mostrados en la **tabla 5.3**, indican que la cantidad de Pt⁰ y, por tanto, de NPs generadas en su interior aumentaron a medida que se incrementaba dicha concentración.

Tabla 5.3. Cantidad de Pt en el interior exosomal ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$ proteína exosoma) obtenida por MP-AES de exosomas cargados con diferentes concentraciones crecientes de precursor de Pt.

Concentración de precursor (mM)	Cantidad de Pt en el interior exosomal ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$ proteína exosoma)
0,06	0,156
0,12	0,306
0,3	0,560
0,6	0,860

Los resultados de NTA revelaron que el tamaño de los exosomas no se veía afectado por la presencia de las PtNPs en su interior (**figura 5.28**). En el caso de las hpMSCs, los exosomas control y los cargados con las PtNPs presentaron unos diámetros de $161,3 \pm 61,9$ nm y $138,9 \pm 46,6$ nm, respectivamente. Por su parte, en el caso de las células U251-MG, los exosomas presentaron diámetros de $185,2 \pm 78,5$ nm y $142,0 \pm 59,3$ nm en ausencia o presencia de PtNPs, respectivamente.

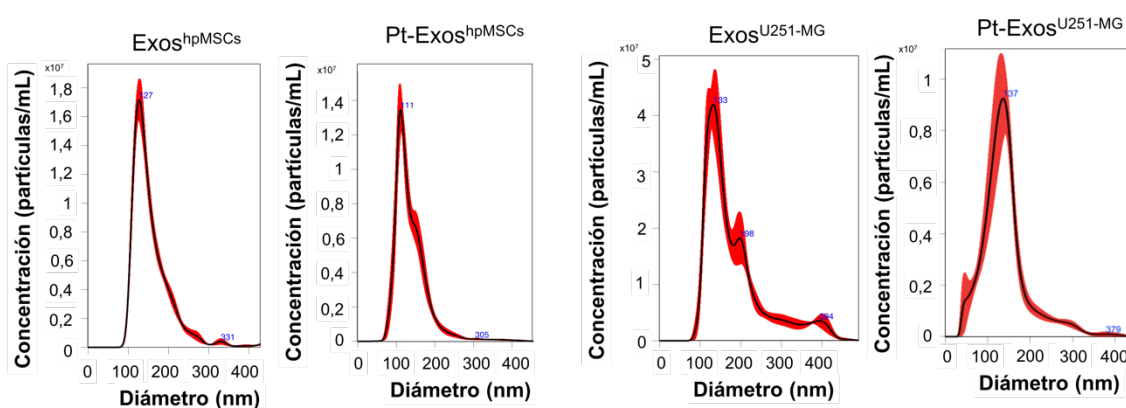


Figura 5.28. Gráficos de NTA de exosomas derivados de células hpMSCs y U251-MG en ausencia y en presencia de PtNPs en su interior.

Finalmente, el WB permitió verificar la expresión de las proteínas exosomales CD9 y CD81, tanto de los exosomas control como de los exosomas cargados con Pt, derivados de células tumorales U251-MG y de células hpMSCs (**figura 5.29**). Como era

5. Encapsulación por reducción en atmósfera de CO

de esperar por los resultados obtenidos con los otros metales, se confirma que la presencia de estas partículas no afectaba a la expresión de CD9 ni de CD81 (se observaron bandas de estas proteínas en torno a 25 y 26 kDa, respectivamente).

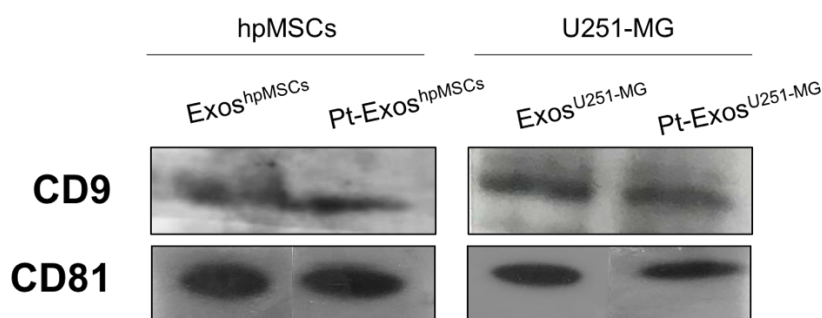


Figura 5.29. WB de exosomas derivados de hpMSCs y U251-MG (tanto control como cargados con partículas de Pt).

5.4. Conclusiones

En este capítulo se han descrito los resultados referentes al empleo de CO como agente reductor de diferentes precursores iónicos para inducir la síntesis de PdNSs, AuNPs y PtNPs en el interior de exosomas.

Este método se caracteriza por su rapidez, por la facilidad de ser adaptado en función del objetivo de la síntesis (versatilidad), por la ausencia de productos tóxicos y por la ausencia de etapas posteriores de purificación y lavado, lo que aumenta el potencial de aplicación de esta estrategia para sintetizar nanomateriales con gran aplicación biomédica. Se ha comprobado como modificando el tipo, la concentración de precursor, así como el tiempo de exposición al CO, se puede cambiar la composición, el tamaño y la carga de las diferentes nanoestructuras, permitiéndonos generar una gran variedad de tipos de partículas en el interior de exosomas con un amplio abanico de aplicaciones en el campo de la biomedicina. La morfología queda además determinada por la interacción del agente reductor con el cristal en crecimiento, produciendo láminas en el caso del Pd, debido a la adsorción preferencial del CO.

Finalmente, es importante destacar que, con todos los tipos de nanoestructuras metálicas, se preservó la integridad, morfología, estructura y funcionalidad de los exosomas tratados.

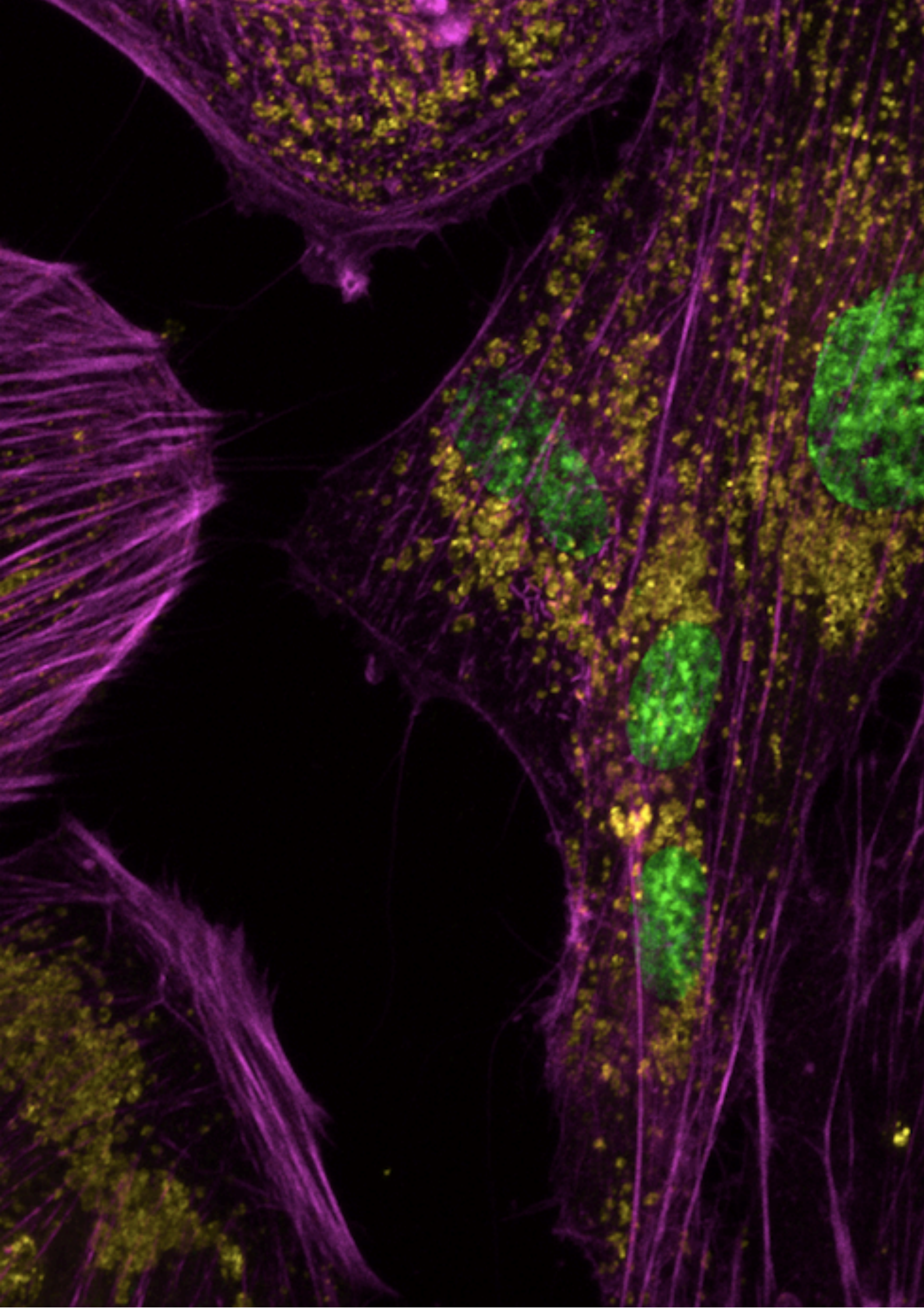


Imagen de microscopía confocal de células madre mesenquimales de placenta humana.

Marcaje de la actina (rosa), ruta endosomal (amarillo) y núcleos (verde).

6. Exosomas y nanopartículas como agente de imagen y diagnóstico del cáncer

6. Exosomas y nanopartículas como agente de imagen y diagnóstico del cáncer

6.1. Introducción

Los exosomas se consideran herramientas diagnósticas prometedoras debido a: 1) su papel como transportadores de biomarcadores de patologías específicas, y por tanto su potencial de diagnóstico como biopsia líquida; y 2) la posibilidad de servir como plataformas de liberación y vehiculización de agentes de imagen y seguimiento (**figura 6.1**).

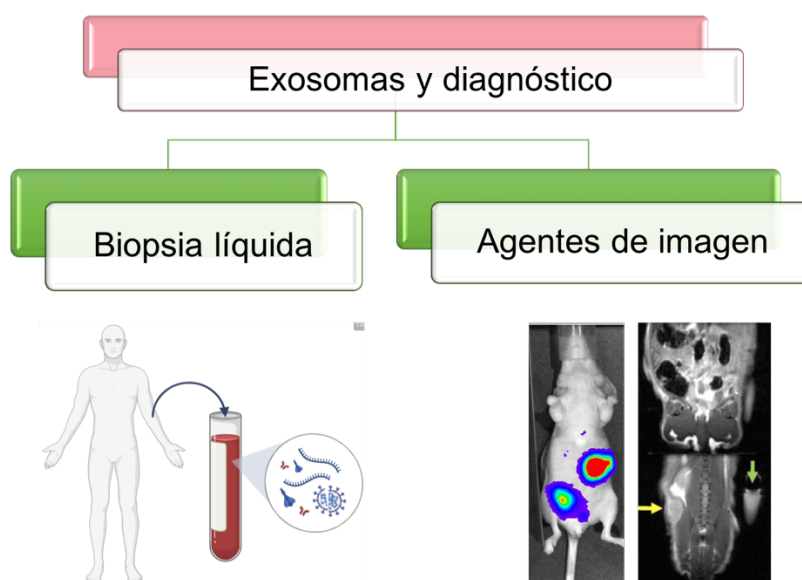


Figura 6.1. Principales estrategias de imagen y diagnóstico mediadas por exosomas: elementos diagnósticos no invasivos y vehículos de agentes con propiedades de imagen.

La biodisponibilidad y la accesibilidad de los exosomas en prácticamente todos los fluidos corporales (sangre, semen, leche materna, orina, fluido cerebroespinal, sudor o saliva) les convierten en biomarcadores diagnósticos muy útiles y poco invasivos.^{250,251,252} Algunos trabajos han descubierto que el genoma, proteoma y el transcriptoma de los exosomas reflejan la composición de sus células parentales, describiéndolos como huellas moleculares para el diagnóstico, monitorización y seguimiento de diversas patologías (incluidas Parkinson, Alzheimer, diabetes, enfermedades cardíacas, infecciosas o incluso cáncer).^{105,253,254,255,179,256,257,258,180} El caso concreto de los exosomas tumorales (derivados de células cancerosas), ha atraído un gran interés en aplicaciones de diagnóstico no invasivo así como de seguimiento de la respuesta a un determinado tratamiento. Algunas de las características que

convierten a los exosomas en agentes prometedores para el diagnóstico de tumores en fases tempranas a través de una biopsia líquida son: 1) su contenido (proteínas o ARNs), que refleja la composición y el estado molecular de la célula de origen; 2) las biomoléculas presentes en su interior están protegidas por la membrana lipídica que rodea estas vesículas; 3) son estables a pH y temperatura fisiológicos; 4) pueden almacenarse durante tiempos prolongados; y 5) dado que las células tumorales secretan gran cantidad de exosomas comparado con células sanas, éstos son muy abundantes en sangre de pacientes con cáncer. Otras características importantes que potencian el empleo de estos exosomas en diagnóstico por biopsia líquida son la mínima invasividad de la técnica, su bajo coste y la reducción en el daño al paciente (p.ej. comparado con biopsias tradicionales realizadas con cirugía, punción profunda mediante aguja o procedimientos endoscópicos).

Aparte del uso de exosomas en biopsias líquidas, también se ha publicado su empleo para vehicular agentes con propiedades de imagen a zonas de inflamación y daño. Dadas sus características y especialmente sus propiedades de direccionamiento selectivo hacia tejidos y células diana discutidas en capítulos previos, algunos autores han propuestos el uso de estas vesículas extracelulares para hacer llegar específicamente ciertas moléculas o NPs con propiedades de imagen a zonas selectivas del organismo para ser visualizadas por diferentes técnicas como: tomografía computarizada por emisión de fotón simple (SPECT), CT, tomografía por emisión de positrones (PET) o MRI.^{259,260} Por ejemplo, Betzer y cols., evidenciaron la acumulación de exosomas derivados de células madre marcados con AuNPs en regiones dañadas del cerebro de ratones tras sufrir un ictus mediante CT (incluso 24 horas después de la administración intranasal). En ratones control (sin daño cerebral) no se observó esta acumulación.¹²³ Estos resultados apoyan el empleo de exosomas para vehicular moléculas o NPs diagnósticas hacia zonas de inflamación, daño o regiones tumorales. También se ha publicado el empleo de exosomas derivados de células madre de tejido adiposo como herramientas de imagen naturales multimodales con aplicación en cirugías guiadas por imagen en cáncer de colon mediante su visualización por PET-CT y fluorescencia con infrarrojo cercano (NIRF).²⁶¹

En este capítulo se evalúan las características de los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} como vectores de visualización de células vivas en cultivo y como posibles herramientas para imagen por CT. Además, se estudian las propiedades de los exosomas cargados con *Perfecta* como agentes de contraste para imagen de células *in vitro*, así como de zonas tumorales por ¹⁹F-MRI *in vivo* en un modelo de xenotrasplante. Previamente, se muestra el desarrollo de un dispositivo microfluídico para la captura de exosomas con

vista a la realización de una biopsia líquida, demostrando el concepto para pacientes con cáncer de páncreas (CP).

6.2. Microdispositivo para el aislamiento de exosomas de sangre periférica de pacientes con CP

Dado que los exosomas son claves en la transferencia intercelular de proteínas y ácidos nucleicos y que particularmente, los derivados de células tumorales reflejan la composición molecular y el estado metabólico de sus células parentales,²⁶² el ámbito de la oncología es probablemente dónde el uso de estas vesículas como agente de diagnóstico tiene más potencial de aplicación. Los exosomas tumorales no sólo reflejan el estado molecular de la célula secretora, sino que además se producen en mayor proporción comparado con células sanas.²⁶³ Balaj y *co/s.*, han demostrado que una célula tumoral de melanoma secreta desde 7000 hasta 25000 vesículas en 48 horas, mientras que un fibroblasto sano produce del orden de 3800 a 6200 vesículas en el mismo tiempo.²⁶⁴ Estas características hacen de los exosomas cancerosos circulantes biomarcadores prometedores para realizar una biopsia líquida capaz de proporcionar información específica sobre el estado, evolución o progreso de un tumor a través de métodos no invasivos o mínimamente invasivos.^{265,109} Malla y *co/s.*, demostraron que la expresión de miRNAs exosomales antes y después del tratamiento con radioterapia, servían como potencial indicador de la respuesta de pacientes con cáncer de prostata al tratamiento.²⁶⁶ Otro estudio evidenció la expresión de proteínas exosomales de manera diferencial en exosomas derivados de células de CP altamente metastásicas (Panc01-H7) comparado con los niveles de exosomas derivados de células poco agresivas (Panc01), proporcionando una herramienta no invasiva para clasificar los tumores pancreaticos en función de su agresividad.²⁶⁷

El seguimiento del estado de un tumor mediante una biopsia líquida basada en exosomas también tiene ventajas comparado con su seguimiento a partir de células tumorales circulantes (CTC), ya que la concentración de exosomas tumorales en sangre es significativamente mayor comparado con sus CTC (1-10 CTC/mL frente a 10^9 exosomas/mL). Esta abundante cantidad de exosomas permite la detección y el diagnóstico del cáncer en estadios tempranos, en los cuales la cantidad de CTC es indetectable,^{268,66,96} todo ello favoreciendo el diagnóstico de la enfermedad antes de que se desarrolle una fase metastásica, mejorando el pronóstico del paciente.

La ultracentrifugación diferencial es el método más utilizado para aislar exosomas de fluidos biológicos. Esta estrategia se fundamenta en la eliminación

sucesiva de células, residuos o fragmentos celulares y orgánulos de mayor tamaño debido a su tamaño y densidad diferentes.²⁶⁹ Se trata de una técnica laboriosa, lenta, cara y, en el caso de aislar exosomas de sangre entera, con bajos rendimientos de purificación (entre un 5 y un 40 %).²⁷⁰ Además, necesita grandes volúmenes de muestra, lo cual supone una limitación importante en el caso de trabajar con muestras de sangre de pacientes.²⁶⁹ Otros métodos alternativos para la purificación de exosomas (a menudo usados en combinación con la ultracentrifugación) son la precipitación, el aislamiento por inmutafinidad, la ultrafiltración y la cromatografía de exclusión por tamaño. Sin embargo, estas tecnologías también presentan grandes limitaciones ya que: 1) frecuentemente se necesitan reactivos y disolventes adicionales; 2) son costosas en tiempo; 3) a menudo tienen una baja reproducibilidad y 4) la fracción exosomal puede presentar impurezas.²⁷¹ La presencia de estos contaminantes no exosomales (microvesículas, lipoproteínas, virus, bacterias, ADN, cuerpos apoptóticos y agregados proteicos) dificultan el uso de los exosomas como agente de diagnóstico en el ámbito clínico, ya que podrían dar lugar a falsos positivos o negativos, induciendo a un error en el diagnóstico del paciente.²⁷²

Comparado con los métodos anteriores, las plataformas microfluídicas suponen una alternativa atractiva para el aislamiento de exosomas a partir de muestras complejas como por ejemplo, de sangre periférica.^{273,274} Algunas de sus principales ventajas comparado con los métodos de aislamiento de exosomas convencionales son, una separación de los exosomas muy específica con alto grado de pureza, una alta uniformidad en la población exosomal aislada y la rapidez del método.^{273,275,96} Entre los sistemas microfluídicos, destacan los abordajes basados en inmutafinidad y captura magnética por anticuerpos que reconocen específicamente proteínas localizadas en la superficie de la membrana exosomal (p.ej. CD63, CD9 o CD81). Los anticuerpos se anclan habitualmente a MNPs que son fácilmente separables del fluido.

De entre los materiales usados para fabricar MNPs, destacan los óxidos de hierro dadas sus propiedades: alta saturación de magnetización, estabilidad química y coloidal, biocompatibilidad y baja toxicidad comparado con los metales puros. Dentro de los óxidos de hierro, las NPs de magnetita han sido las más ampliamente utilizadas en aplicaciones biomédicas. Una de las principales desventajas de la síntesis de NPs de magnetita es la dificultad para obtener NPs monodispersas, tanto lo referido a sus tamaños primarios como a su estado de agregación.²⁷⁶ En general, estas NPs están compuestas por un núcleo de óxido de hierro, que presenta un comportamiento superparamagnético, frecuentemente rodeado de una capa de un material diferente pudiendo ser inorgánico y orgánico, que le otorga las propiedades deseadas. Esta

corona puede anclarse químicamente o puede adsorberse físicamente al núcleo de óxido de hierro. En ocasiones actúa como surfactante, aportando estabilidad coloidal a las partículas en disolución y disminuyendo su grado de aglomeración.²⁷⁷ También se ha descrito la unión de diversos ligandos y grupos funcionales (enzimas, anticuerpos o nucleótidos) para dotar a las MNPs de selectividad hacia tejidos o células diana.^{278,279} Además, se pueden acoplar diferentes grupos biológicos, fármacos, moléculas terapéuticas, sondas fluorescentes o reactivos en la superficie de dichos materiales mejorando las propiedades inherentes de las mismas, generando así vectores multifuncionales con varias aplicaciones en la misma partícula (**figura 6.2**).

Como ejemplo de una aproximación a esa línea, recientemente Efremova y cols., han descrito la síntesis de nanocristales octaédricos de magnetita crecidos sobre semillas de oro los cuales exhiben tiempos de relajación T2 mejores que contrastes de imagen comerciales, convirtiéndolos en candidato para ser usado como agente de MRI. Además, acoplaron una sonda fluorescente (Cy5) y un fármaco (DOX) a los complejos de magnetita y oro, sirviendo como vector multifuncional de imagen y de terapia tanto *in vitro* como *in vivo*.²⁸⁰

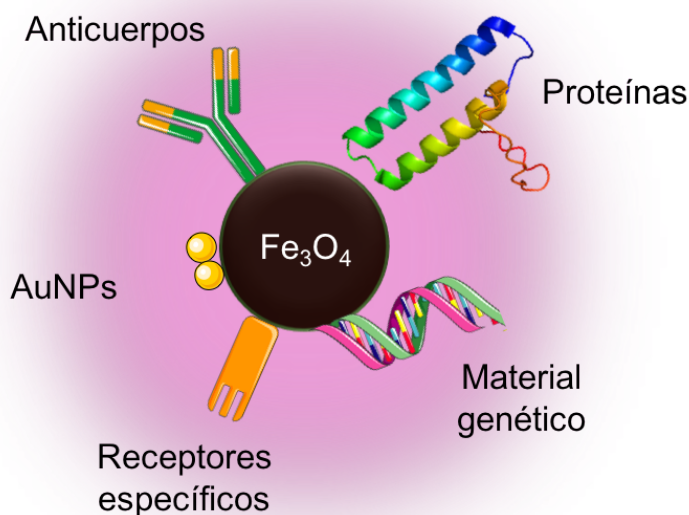


Figura 6.2. Esquema de posibilidades para configurar una partícula de magnetita multifuncional con un núcleo de óxido de hierro y una corona con diferentes ligandos biológicos.

El CP es uno de los tumores gastrointestinales más agresivo. Su diagnóstico y detección precoz es particularmente importante ya que el 90 % de los pacientes diagnosticados fallecen pasado el primer año del diagnóstico.²⁸¹ El análisis de la proteína CA19-9 sérica es actualmente el único ensayo aprobado por la FDA para el

diagnóstico y el seguimiento de la respuesta al tratamiento de este cáncer.²⁸² Sin embargo, su detección no es suficientemente específica; y en numerosas ocasiones proporciona resultados falsos, tanto positivos como negativos. Así, se han encontrado niveles elevados de esta proteína en sangre de pacientes con enfermedades inespecíficas tales como daño hepático, enfermedad pancreática benigna e incluso en pacientes asintomáticos.^{283,284} Por su parte, algunos pacientes con CP presentan niveles de CA19-9 dentro del rango considerado como normal, impidiendo el diagnóstico de la enfermedad^{285,286}. Es por ello que todavía resulta imprescindible investigar métodos de diagnóstico tempranos más sensibles y fiables.

Algunos estudios han utilizado exosomas derivados de células tumorales como agentes de diagnóstico por biopsia líquida asociados a plataformas microfluídicas para diagnóstico del CP. Kanwar y *cols.*, publicaron un dispositivo funcionalizado con un anticuerpo anti-CD63 para el aislamiento de exosomas de suero de pacientes con CP metastásico. Una vez aislados, estos exosomas se cuantificaron utilizando un colorante de carbocianina fluorescente que se une específicamente a los mismos.²⁸⁷ En otro trabajo, se diseñó un sistema microfluídico multicanal para purificar estas vesículas a través de un reordenamiento inmunomagnético basado en el reconocimiento de las proteínas CD9, CD81 y EpCAM. La carga diferencial de ARN de estos exosomas permitió la identificación y diagnóstico del CP en un estudio ciego.²⁸⁸ Por su parte, Teller y *cols.*, emplearon un abordaje microfluídico para analizar el ARN de exosomas de CP mediante la lisis del exosoma con ondas acústicas de superficie y una nanomembrana de intercambio iónico.²⁸⁹

En esta sección se presenta un microdispositivo basado en captura magnética por inmunoafinidad para el aislamiento de exosomas presentes en sangre periférica de pacientes con CP y su potencial como agente diagnóstico. En primer lugar, se sintetizaron partículas de magnetita funcionalizadas con un anticuerpo anti-CD9 para aislar exosomas presentes en muestras de diferente complejidad (PBS, FBS o sangre entera). Para verificar la naturaleza exosomal de dichas vesículas aisladas se realizó un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) frente a otra proteína exosomal (CD63), comprobando así la coexpresión de ambas tetraspaninas en los complejos purificados. Se analizaron los niveles exosomales de CA19-9 presentes en las vesículas purificadas de sangre periférica de pacientes con CP y de donantes sanos, para finalmente compararlos con los niveles de CA19-9 sérico de dichos pacientes. Los resultados de esta sección demuestran la posible aplicabilidad de este microdispositivo como plataforma diagnóstica basada en el uso de exosomas como biomarcadores para el diagnóstico y el seguimiento del CP.

6.2.1. Experimental

6.2.1.1. Síntesis de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-EDC-NHS-NPs}$

Los reactivos utilizados para sintetizar estas NPs fueron: citrato de sodio dihidratado, hidróxido de sodio, nitrato de sodio, sulfato de hierro (II) hidratado, EDC y NHS, todos ellos suministrados por Sigma Aldrich. Las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ utilizadas en la captura magnética del microdispositivo desarrollado en esta memoria se sintetizaron escalando un protocolo previamente publicado por Hui y cols.²⁹⁰ El montaje experimental se muestra en la **figura 6.3**.

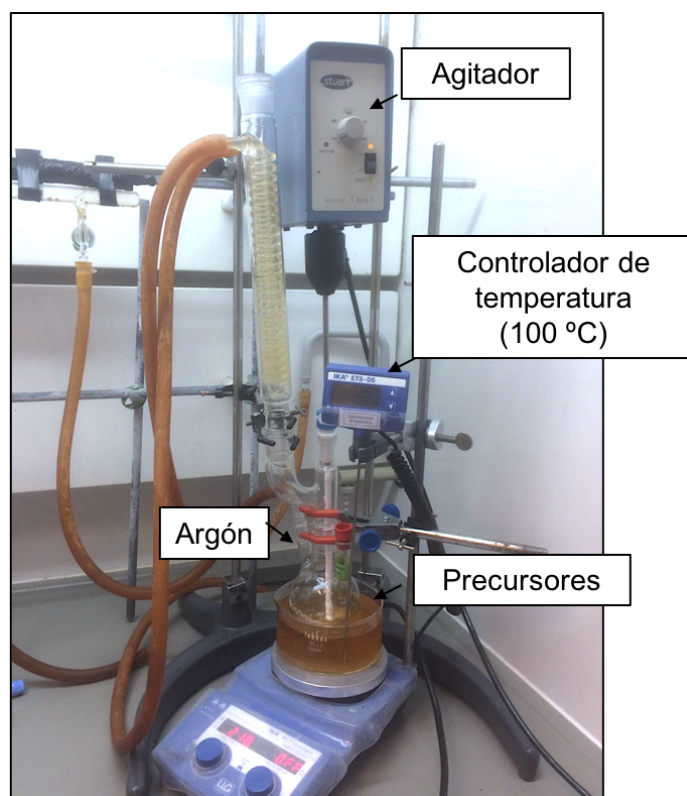


Figura 6.3. Imagen del sistema experimental utilizado para la síntesis de las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$: agitador con varilla recubierta con teflón, reflujo para minimizar evaporación del disolvente, matraz de tres bocas (una boca para la entrada de argón, otra para introducir los reactivos necesarios para la síntesis y otra para la varilla agitadora) y una placa calefactora con control de temperatura.

Resumidamente, se mezclaron 2 mmol de citrato de sodio dihidratado con 8 mmol de hidróxido de sodio y 0,4 mol de nitrato de sodio en 19 mL de agua destilada en un matraz redondo de 3 bocas. La disolución se calentó hasta 100 °C, y se añadió el sulfato de hierro (4 mmol), observándose un cambio de color instantáneo de una disolución translúcida a una disolución marrón, indicativo de la formación de las partículas. La disolución se mantuvo durante 1 h a 100 °C. La dispersión de NPs se enfrió a temperatura ambiente y las partículas se purificaron y lavaron con agua destilada con ayuda de un imán.

Una vez que se sintetizaron y caracterizaron las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$, se funcionalizaron por medio de un enlace covalente amida utilizando EDC y NHS para conjugar el grupo citrato expuesto en la superficie de las NPs con las aminas primarias localizadas en la región constante del anticuerpo empleado en la captura magnética. Para ello, las partículas se mezclaron con una disolución acuosa de EDC (1:1, p:p) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las MNPs con EDC se mezclaron con una disolución acuosa de NHS (1:1, p:p), formándose un éster de NHS que es significativamente más estable que el intermedio generado entre los grupos carboxilo y EDC (**figura 6.4**). Todo el proceso de funcionalización se realizó a $\text{pH} = 5.5$ en tampón 0,5 M MES. Finalmente, las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-EDC-NHS-NPs}$ se lavaron tres veces con agua destilada, reteniéndose con ayuda de un imán.

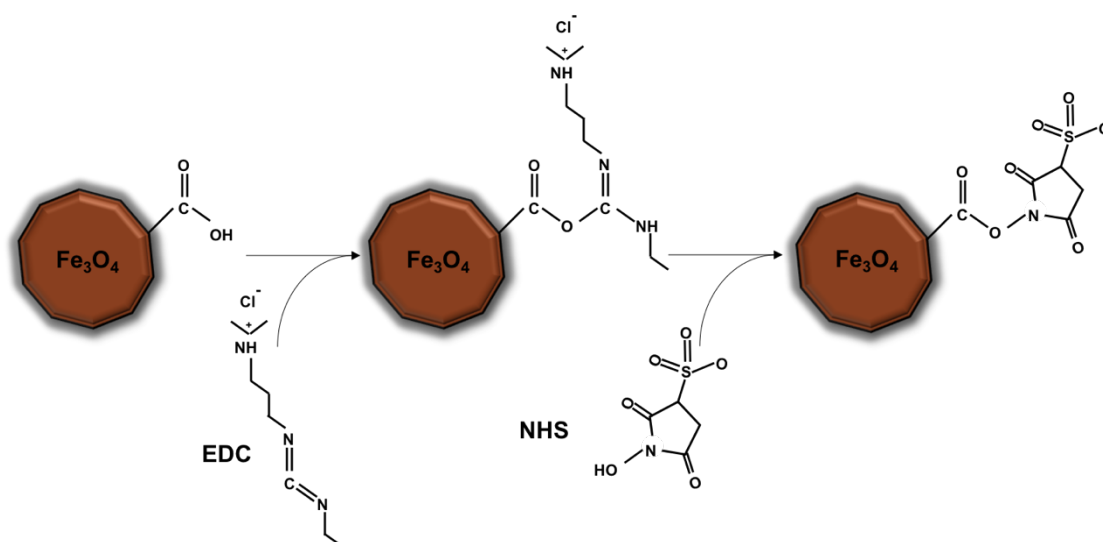


Figura 6.4. Química del EDC-NHS. El EDC reacciona con un grupo carboxílico expuesto en la superficie de la nanopartícula magnética, formando una especie intermedia inestable (O-Acilsourea). A continuación, la adición del NHS estabiliza este intermedio convirtiéndolo en un sulfo-NHS éster, y por tanto incrementando la eficacia de la reacción del EDC.

Las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ desnudas y funcionalizadas, se caracterizaron por varias técnicas fisicoquímicas, incluidas TEM, TGA, FTIR, XPS y DLS. Estas técnicas están descritas detalladamente en el capítulo 3 de esta memoria. Además, sus propiedades magnéticas se midieron con un magnetómetro de muestra vibrante (VSM Lake Shore 7471).

6.2.1.2. Evaluación de la estabilidad de las MNPs

La estabilidad de las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ y las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-EDC-NHS-NPs}$ se analizó por XPS (para determinar su composición atómica elemental, así como el estado del Fe, C y N) y se determinó su potencial zeta pasados 1, 7, 10, 20 y 30 días de sus síntesis.

La preparación de las muestras para los análisis de XPS y potencial zeta, así como las condiciones de ambas mediciones se detallan en el capítulo 3 junto con el resto de técnicas empleadas para la caracterización de los nanomateriales empleados en esta Tesis Doctoral.

6.2.1.3. Unión del anticuerpo anti-CD9 a las MNPs

Tras la activación de los grupos carboxilo de la superficie de las partículas con el EDC y el NHS, se llevó a cabo la reacción con los grupos amino de la región constante del anticuerpo anti-CD9 (Abcam). La **figura 6.5** muestra un esquema de la funcionalización de las partículas con el anticuerpo. Para ello, en primer lugar, se tomaron las NPs y se lavaron de nuevo por separación magnética y se redispersaron en PBS. Posteriormente, con el objetivo de optimizar la funcionalización de las mismas con el anti-CD9, se tomaron cantidades crecientes de NPs activadas y se pusieron en contacto con 1 μg de anticuerpo (200:1, 150:1, 100:1 and 50:1; p:p), en un volumen final de 10 μL . Dichas disoluciones se mantuvieron en contacto durante 4 horas a temperatura ambiente mezclándolas cada 30 minutos con ayuda del agitador vórtex para garantizar la máxima unión. Finalmente, y con el objetivo de eliminar el exceso de anti-CD9 no unido a las NPs, los complejos se lavaron tres veces más con PBS.

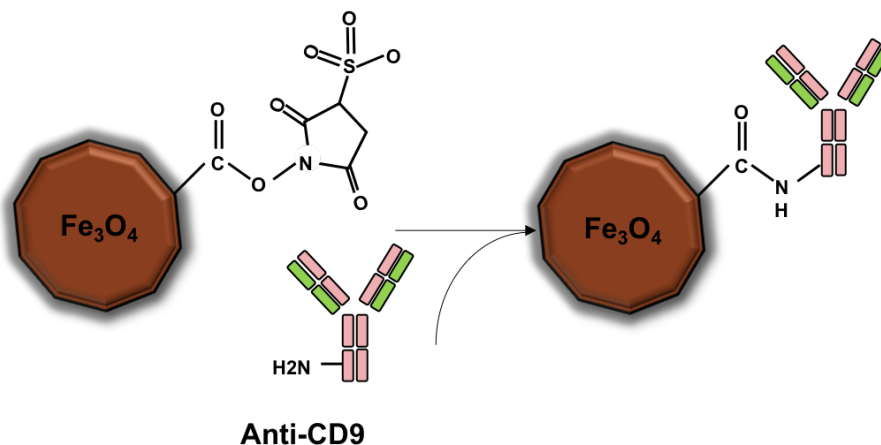


Figura 6.5. Esquema de la unión del anticuerpo a la partícula magnética. El intermedio sulfonilo NHS éster reacciona con los grupos amino presentes en la región constante del anti-CD9 (utilizado para la captura de exosomas), dando lugar a la formación de un enlace amida.

Con el fin de cuantificar la cantidad de anticuerpo conjugado a la superficie de las Fe_3O_4 -EDC-NHS-NPs, el sobrenadante de las disoluciones conteniendo los complejos objeto de estudio con los diferentes ratios de NPs y anticuerpo se midió con un espectrofotómetro UV-VIS (Nanodrop 2000, Thermo) siguiendo la absorción a 280 nm. Posteriormente, el % de anticuerpo unido a las partículas se estimó indirectamente a partir del anticuerpo libre medido en el sobrenadante. Para calcular la concentración

de anticuerpo presente en el sobrenadante a partir de la absorbancia medida en el espectrofotómetro, se empleó la formula mostrada a continuación basada en la absorbancia de los anillos aromáticos de los aminoácidos de las proteínas^{291,292}.

$$Antibody\ concentration\ \left(\frac{mg}{mL}\right) = (1.55 \cdot Abs_{280} - 0.76 \cdot Abs_{260})$$

Una vez estimada la relación óptima de partículas y anticuerpo para formar los complejos (Fe₃O₄-EDC-NHS-NPs:antiCD9), estos complejos se visualizaron en fase líquida por la técnica de contacto intermitente Peakforce de Medición Nanomecánica Cuantitativa (*Quantitative Nanoscale Mechanical, QNM peakforce mapping*) empleando un equipo Multimode 8 (Bruker Co). Durante el estudio, se aplicó una fuerza de 1 nN y se utilizó una punta comercial modelo SNL tipo -C (Bruker). En primer lugar, se analizaron las Fe₃O₄NPs y el anticuerpo anti-CD9 libre y finalmente los complejos de partículas con anticuerpo conjugado. Para visualizar el anticuerpo se llevó a cabo el protocolo previamente reportado por Ido y cols.²⁹³ En primer lugar se depositaron 5 µL de una disolución 50 mM de MgCl₂ sobre un sustrato de mica moscovita recién pulido. Posteriormente 5 µL de la muestra objeto de estudio se depositaron sobre el sustrato. Cinco minutos después, el sustrato de mica se enjuagó suavemente 5 veces con agua destilada para eliminar el exceso de anticuerpo o complejos no unidos.

6.2.1.4. Fabricación y principio de operación del microdispositivo

La **figura 6.6** muestra una fotografía del microdispositivo utilizado en esta sección. Éste consta de dos capilares que actuaran como vías de entrada (1 y 2) para formar un tubo coaxial mediante un conector en forma de T. El capilar externo 1, (por el cual entrará la muestra de la que se desean extraer los exosomas) se fabricó con el polímero hidrofóbico politetrafluoroetileno (PTFE). Se eligió este polímero hidrofóbico en el capilar externo con el objetivo de evitar la adhesión a su superficie de proteínas sanguíneas y otras biomoléculas. La largura de este tubo fue de 10,5 cm (6,5 cm desde el final del capilar interno hasta el primer imán). Esta longitud era lo suficientemente larga como para asegurar la completa mezcla de ambos fluidos y consecuentemente, la interacción entre el anticuerpo anti-CD9 (presente en la superficie de las partículas) y los exosomas objeto de captura antes de ser inmovilizados en el imán.²⁹⁴ Por su parte, el capilar interno 2 (por el que circularán las MNPs con el anticuerpo conjugado a su superficie) se fabricó con el polímero hidrofílico poli éter éter cetona (PEEK). Las dimensiones se encuentran detalladas en la **figura 6.6**. Las MNPs funcionalizadas se inyectaron (flujo central) con un caudal de 10 µL/min, mientras que el fluido que contenía los exosomas (flujo envolvente) se inyectó con un caudal de 50 µL/min (relación flujo central: flujo envolvente 1:5). La relación de velocidad de flujo de ambas corrientes fue

5,5; un valor suficientemente alto como para garantizar una mezcla rápida de las MNPs con el fluido que contenía los exosomas.²⁹⁴ La colocación del capilar interno coaxialmente al capilar externo se realizó con ayuda de un microscopio óptico con el objetivo de garantizar un flujo homogéneo, en el cual habría una fase interna (flujo amarillo en la **figura 6.6**) conteniendo las NPs rodeada simétricamente de una fase externa compuesta por el líquido conteniendo los exosomas (flujo azul en la **figura 6.6**). Para evitar la desalineación de los capilares coaxiales, así como favorecer la reproducibilidad de la captura magnética, el sistema se acopló a un carcasa o soporte polimérico diseñado por Autodesk AutoCAD y fabricado mediante una impresora 3D. Además del soporte para el microdispositivo, también se acopló un adaptador para colocar el vial en el que finalmente se recogerá la muestra de exosomas capturados. Se emplearon dos bombas de jeringa (Harvard Apparatus PHD ULTRA™) para inyectar ambas corrientes por sendos capilares.

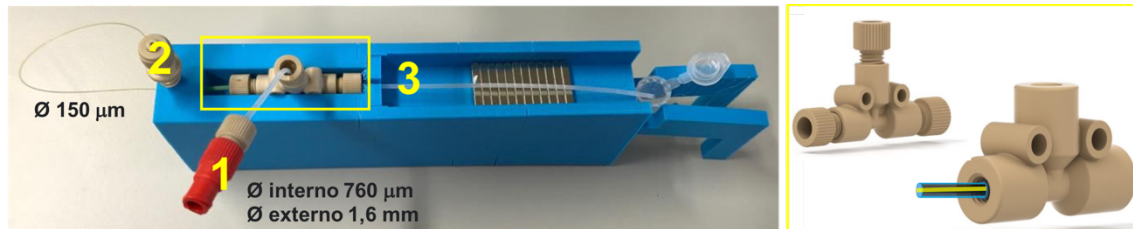


Figura 6.6. Microdispositivo empleado en la captura de los exosomas, mostrando el canal de entrada de la sangre o la muestra conteniendo los exosomas (1), el canal de entrada de las MNPs funcionalizadas con el anticuerpo (2) y el canal de salida a su llegada al imán donde quedarían retenidas las partículas con los exosomas reconocidos. En la parte derecha, el conector en forma en T con el flujo coaxial de las partículas (amarillo) y la muestra con los exosomas (azul).

Este dispositivo coaxial ha permitido la purificación de exosomas directamente desde sangre periférica de pacientes a través de inmunoafinidad y captura magnética mediada por el anticuerpo CD9 (acoplado a la superficie de las partículas), el cual reconoce específicamente esta tetraspanina localizada en la superficie de los exosomas.

Para la inmovilización magnética de los complejos de partículas-exosomas, se utilizó un conjunto de 12 imanes permanentes de NdFeB con una polarización alterna con el fin de generar un gradiente de campo magnético creado entre cada imán y el contiguo para lograr capturar las partículas con los exosomas una vez reconocidos. La simulación de la distribución del campo magnético producida por el ensamblaje de los imanes se ha realizado con el software FEMM (**figura 6.7**).

6. Exosomas y nanopartículas. Agente de imagen y diagnóstico

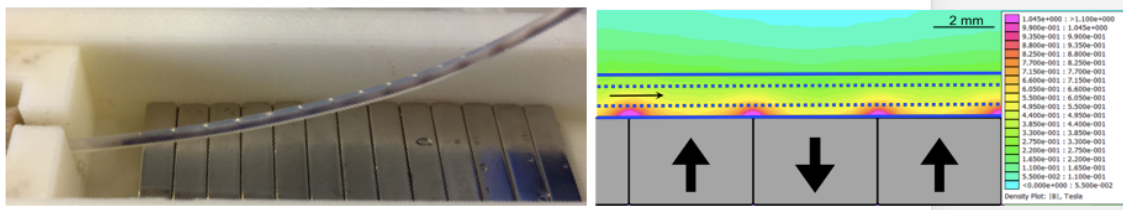


Figura 6.7. Izquierda: captura magnética de las partículas en las zonas con mayor densidad de campo magnético. Derecha: diagrama que muestra la simulación de la distribución del campo magnético producido por el ensamblaje de tres imanes realizado con el software FEMM.

El principio de operación, así como las etapas que componen el protocolo de aislamiento de los exosomas en el microdispositivo se describen en la **figura 6.8**.

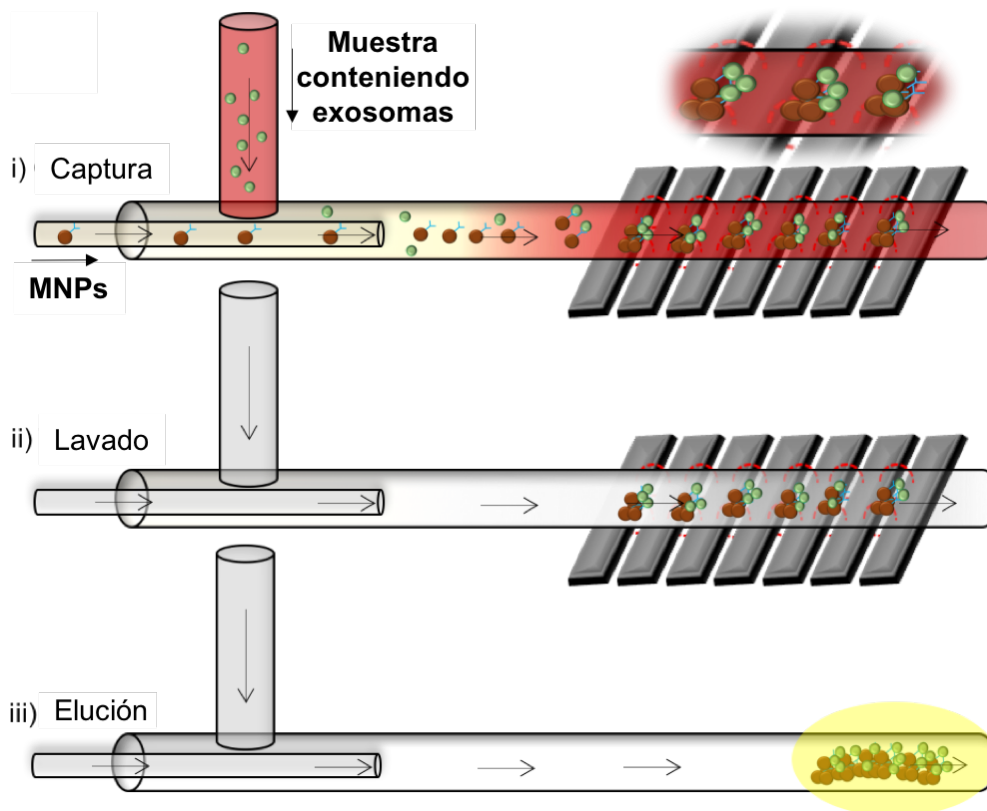


Figura 6.8. Etapas en el proceso de captura de los exosomas en el interior del microdispositivo: captura, lavado y elución.

En primer lugar, la muestra conteniendo los exosomas se pasa por el capilar externo a una velocidad de $50 \mu\text{L}/\text{min}$ (mostrado como rojo y los exosomas en verde) y paralelamente, la solución de las partículas conjugadas al anticuerpo CD9 (mostradas en marrón) se inyectan por el capilar interno a una velocidad de $10 \mu\text{L}/\text{min}$. Posteriormente, se genera un flujo coaxial en el que las partículas quedan localizadas en la fase interna, rodeadas por los exosomas presentes en la muestra. Dicho fluido recorrió el capilar a la vez que se producía la interacción entre el anticuerpo anti-CD9 (presente en la superficie de las partículas) y los exosomas objeto de captura, para

finalmente llegar al imán sobre el cual se fueron inmovilizando todos los complejos de partículas con los exosomas capturados. Posteriormente, se realizaron tres etapas de lavado con PBS por ambos capilares con el objetivo de eliminar todas las biomoléculas presentes en la muestra que no habían sido reconocidas por el anticuerpo y, por tanto, no se habían inmovilizado en el campo magnético creado por los imanes. Por último, se retiraron los imanes y se pasó 1 mL de PBS para recoger toda la muestra capturada en un vial y proceder a su análisis final.

6.2.1.5. Captura de los exosomas

Para verificar la funcionalidad de las NPs recubiertas con el anticuerpo, los complejos de nanopartículas:anticuerpos (NPs:Ab) (con ratios 50:1 y 100:1, p:p) se incubaron a temperatura ambiente con 40 µg de exosomas durante 1 y 2 horas. Pasado este tiempo, se precipitaron los complejos magnéticos con ayuda de un imán y se estimó la cantidad de exosomas capturados de forma indirecta midiendo la cantidad de exosomas libres presentes en el sobrenadante con ayuda de un ensayo BCA (descrito en detalle en el capítulo general de materiales y métodos), un método ampliamente extendido y estandarizado para cuantificar exosomas. Conociendo la cantidad inicial de exosomas y así como los no capturados presentes en el sobrenadante, se estimó la cantidad de vesículas reconocidas.

6.2.1.6. Preparación de las muestras de PBS, FBS y sangre

La captura de los exosomas en el microdispositivo se realizó utilizando muestras biológicas de complejidad creciente. En primer lugar, se empleó PBS enriquecido con exosomas purificados a partir de cultivos celulares por ciclos de ultracentrifugación. También se capturaron exosomas dispersos en FBS. Por último, se utilizó sangre entera de pacientes con CP, así como de donantes sanos. Todos los ensayos que implicaban el uso de muestras y materiales humanos fueron previamente aprobados por el Comité de Ética de la Investigación de la Comunidad de Aragón (CEICA), con el Proyecto *Extracción de exosomas de tumores y plasma de pacientes con diversos grados de malignidad, para el estudio de su composición y correlación clínica* (PI 18/198), en colaboración con el Dr. Roberto Pazo (**anexo 3**). Los participantes fueron debidamente informados y proporcionaron el consentimiento informado por escrito para poder formar parte de este estudio. En concreto, se han utilizado tres muestras de donantes sanos y siete muestras de siete pacientes con CP. Todos los pacientes con CP presentaban un adenocarcinoma en la cola del páncreas, en fase IV recién diagnosticado y la toma de la muestra se realizó previamente al inicio de la primera sesión de tratamiento. La recogida de muestras se realizó en el Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza

en tubos Vacutainer de citrato de sodio. Las muestras se almacenaron durante 2 horas a 4 °C antes de ser procesadas en el microdispositivo. Los exosomas se purificaron a partir de 500 µL de sangre periférica de cada paciente.

6.2.1.7. Inmunocaptura de los exosomas en el microdispositivo

Para la captura de los exosomas en el microdispositivo, en primer lugar, se conjugaron 20 µg de Fe₃O₄-EDC-NHS-NPs con 200 ng de anti-CD9 en 50 µL de PBS durante 4 horas. Pasado este tiempo, se eliminó el exceso de anticuerpo no conjugado y los complejos Fe₃O₄-EDC-NHS-NPs:antiCD9 se suspendieron en 500 µL de PBS. Posteriormente, se introdujeron las MNPs, y en paralelo la muestra con los exosomas susceptibles de ser capturados. Como control negativo se utilizaron Fe₃O₄-EDC-NHS-NPs desnudas (es decir, sin conjugarse al anti-CD9 exosomal). Los exosomas capturados se caracterizaron por TEM, ELISA y NTA.

El número de exosomas capturados se cuantificó mediante un ensayo ELISA (ExoELISA-ULTRA CD63, Systems Biosciences) siguiendo las especificaciones del fabricante. Resumidamente, los complejos capturados en el microdispositivo (Fe₃O₄-EDC-NHS-NPs:antiCD9-exosomas) se depositaron en una placa de 96 pocillos y se incubaron con el anticuerpo primario durante una hora. Pasado este tiempo un anticuerpo secundario conjugado a la enzima HRP se añadió sobre la muestra para amplificar la señal y finalmente, el sustrato colorimétrico de la enzima HRP se añadió con el objetivo de medir la aparición del producto colorimétrico con un pico de absorbancia máximo a 450 nm. La acumulación de este producto es proporcional a la cantidad de exosomas presentes en la muestra, es decir, capturados por el microdispositivo. El tamaño y la concentración de los exosomas capturados se evaluó también por NTA (Malvern Instruments). Para ello, se eluyeron con PBS los complejos Fe₃O₄-EDC-NHS-NPs:antiCD9-exosomas inmovilizados en el imán, y se sonicaron en un baño durante unos segundos para garantizar su homogeneización antes de ser medidos en el NTA a temperatura ambiente, en triplicado y durante 60 segundos.

6.2.1.8. ELISA CA19-9 de los exosomas capturados

Para cuantificar la cantidad de CA19-9 presente en los exosomas localizados en la sangre de pacientes con CP, se introdujeron 500 µL de sangre entera por el microdispositivo y se aislaron magnéticamente, como se ha descrito anteriormente. Los niveles de CA19-9 presentes en dichos exosomas capturados se analizaron con el kit CA19-9 Human ELISA (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Para garantizar que se medía el CA19-9 exosomal (y no la proteína CA19-9 libre) y con el objetivo de evitar interferencias, el análisis del CA19-9 exosomal se realizó

en los complejos capturados en el imán simulando un ensayo ELISA en sándwich con el anti-CD9 conjugado a la partícula y el anti-CA19-9 procedente del kit.

En la **figura 6.9** se muestra un esquema de los ensayos ELISA desarrollados en los exosomas capturados. El ELISA 1 se realizó para cuantificar la cantidad de exosomas capturados en el microdispositivo a través del anticuerpo CD63. De esta forma, se verifica la co-expresión de dos proteínas exosomales (CD9 y CD63) en los complejos aislados. Por otro lado, con el ELISA 2 se analizó la cantidad de CA19-9 exosomal para validar su aplicabilidad como biomarcadores tumorales.

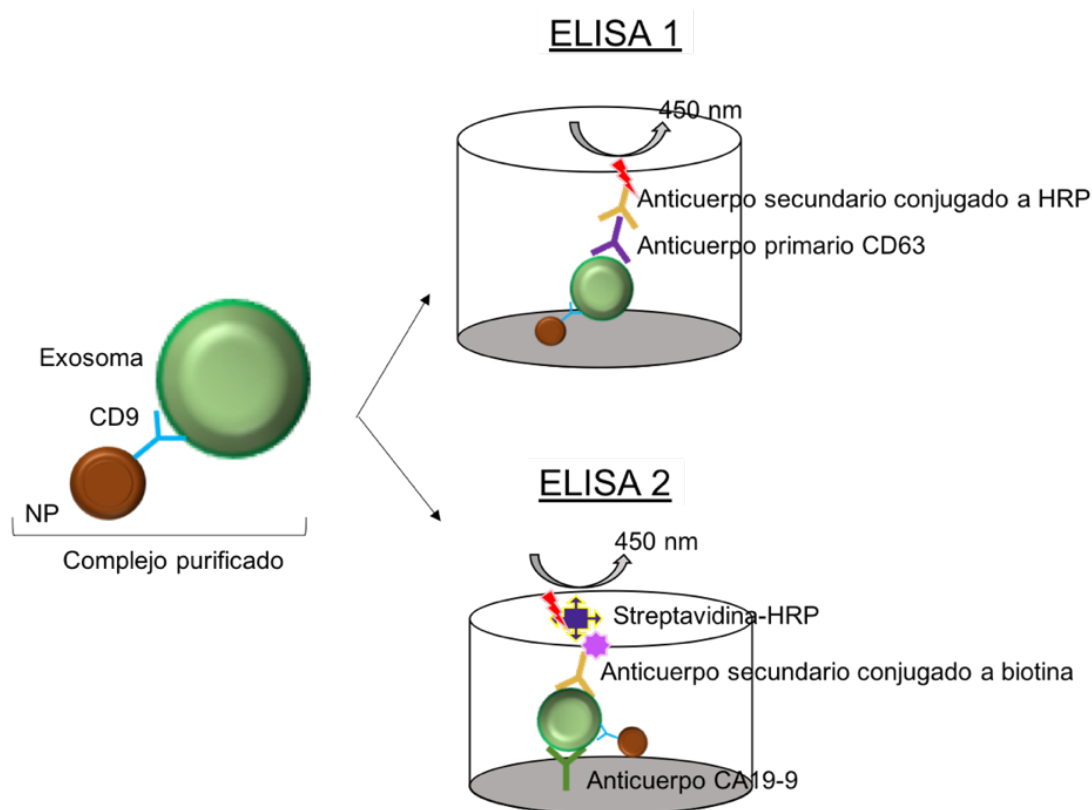


Figura 6.9. Ensayos ELISA realizados a los exosomas capturados en el microdispositivo: ELISA 1 y ELISA 2 para detectar la proteína exosomal CD63 y el antígeno tumoral CA19-9, respectivamente.

6.2.2. Resultados y discusión

6.2.2.1. Caracterización de las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-EDC-NHS-NPs}$

Varios artículos han descrito la síntesis de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ para desarrollar métodos de captura magnética para el aislamiento de exosomas.^{287,295,275} Las estrategias empleadas para conjugar anticuerpos a NPs incluyen procesos basados en uniones covalentes y no covalentes (p.ej. interacciones específicas *host-guest*). Sin embargo, en los últimos años una de las estrategias más ampliamente empleada ha sido el uso de enlaces carboxilo-amino debido a su simplicidad y reproducibilidad.²⁹⁶ Este método

no necesita ninguna modificación previa del anticuerpo y puede llevarse a cabo en un *buffer* convencional y a temperatura ambiente.

La **figura 6.10** presenta imágenes representativas de microscopía electrónica de las partículas desnudas tras su síntesis en presencia del estabilizador de citrato y de las partículas funcionalizadas con el EDC y el NHS. En las imágenes de las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ se muestran NPs de forma poliédrica con aristas y vértices muy marcados, mientras que las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-EDC-NHS-NPs}$ aparecen con una forma más redondeada y menos abrupta comparado con las partículas desnudas. Además, se puede observar claramente una capa de materia orgánica (correspondiente con el EDC y el NHS) rodeando el núcleo de hierro de las partículas. Como puede observarse en las fotografías de TEM, dicha corona de EDC-NHS tuvo un diámetro variable de entre 3 y 10 nm de grosor aproximadamente.

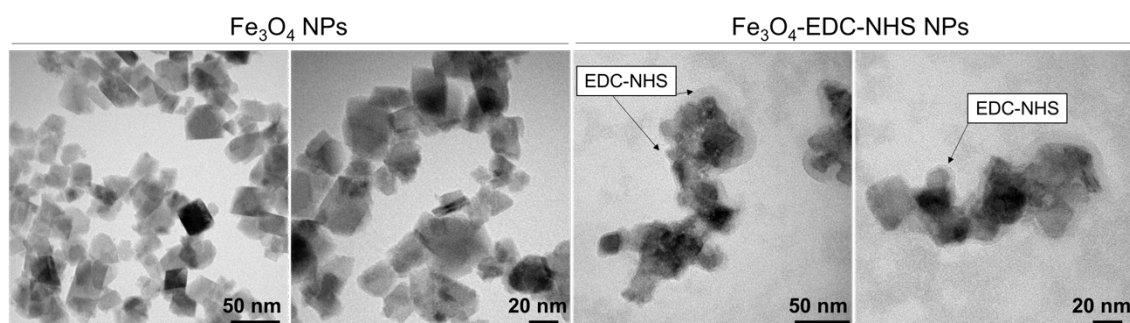


Figura 6.10. Imágenes de TEM de las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (derecha) y de las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-EDC-NHS-NPs}$ (izquierda). En estas últimas es posible observar la corona de PEG bordeando las NPs.

A partir de las imágenes obtenidas por TEM, se realizó un histograma de distribución de tamaños primarios de ambos tipos de partículas (**figura 6.11**). El diámetro obtenido para las partículas desnudas fue de $23,9 \pm 5,7$ nm mientras que cuando éstas fueron recubiertas con el EDC y NHS, se obtuvo un diámetro de $27,5 \pm 4,7$ nm.

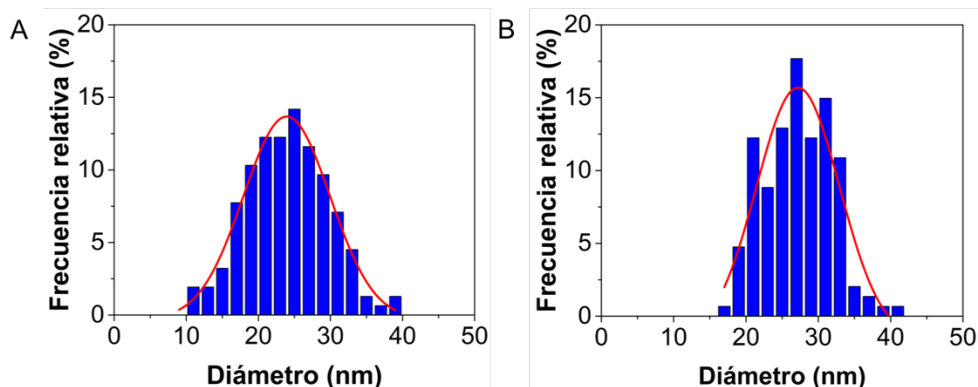


Figura 6.11. Histogramas de distribución de tamaños obtenidos a partir de las fotografías de TEM de las a) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ y b) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-EDC-NHS-NPs}$.

El diámetro de las partículas también se midió por DLS. En este caso, la **figura 6.12** revela un diámetro hidrodinámico para las partículas desnudas de aproximadamente 62 nm, y cuando las partículas se funcionalizaron, este diámetro aumentó ligeramente. Es importante mencionar que tal y como esperaba, el diámetro hidrodinámico es mayor que el obtenido por TEM. Este hecho es debido a que por TEM medimos los diámetros primarios de las NPs, independientemente de su estado de agregación en solución. En cambio, por DLS se obtiene la distribución de tamaños hidrodinámicos, lo que representa la distribución de los agregados que se forman en disolución. Lógicamente, este valor sería igual al de las partículas primarias si estas estuvieran dispersas individualmente. Un diámetro DLS de 62 nm frente a un diámetro primario de 27,5 nm revela un grado de agregación moderado.

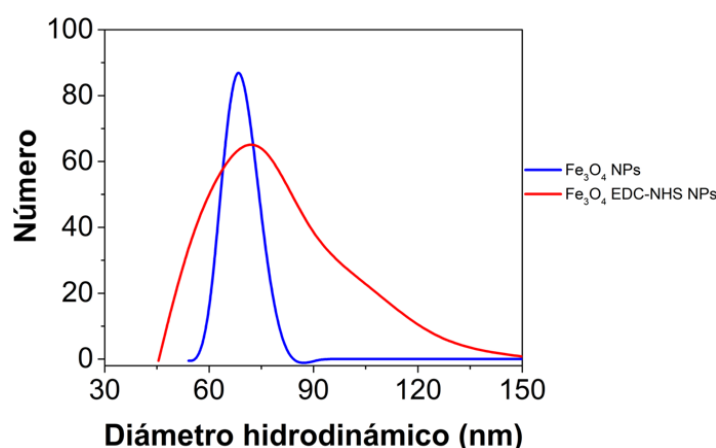


Figura 6.12. Tamaño de las partículas obtenido por DLS.

Los espectros de FTIR del citrato y de las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ sintetizadas se muestran en la **figura 6.13.A**. Puede observarse como el espectro registrado para las NPs de magnetita se asemeja al del citrato puro. En concreto, dos bandas de absorción relativamente intensas aparecen a 1639 cm^{-1} y 1385 cm^{-1} , correspondientes con el estiramiento vibracional o *stretching* asimétrico y simétrico de los grupos COO^- de las moléculas de citrato, respectivamente.²⁹⁷ Además, las bandas de absorción características del estiramiento asimétrico (2925 cm^{-1}) y simétrico (2850 cm^{-1}) del enlace CH_2^- se observaron claramente en las MNPs.²⁹⁸ Estos resultados demuestran que las moléculas de citrato se han incorporado correctamente a la superficie de las partículas.

Los espectros de la **figura 6.13.B** demuestran la correcta funcionalización de las partículas con el EDC y con el NHS. En las partículas funcionalizadas, se observa la aparición de dos picos característicos señalados en amarillo: uno de ellos a 1274 cm^{-1} (banda con forma de corona correspondiente con el “*stretching*” o estiramiento vibracional del enlace C-N)²⁹⁹ y otro a 1650 cm^{-1} (pico asignado al estiramiento del

enlace o “*stretching*” del enlace C=O)³⁰⁰. En la gráfica derecha de la **figura 6.13.B** se muestra un zoom del espectro entre los números de onda 1000 cm⁻¹ y 2000 cm⁻¹. Estos enlaces son característicos de un enlace amida, el cual se forma entre los grupos carboxilo del citrato y los grupos amina del EDC (tal y como se ilustra en el esquema de la **figura 6.4** relativo a la funcionalización de las partículas). En ambos tipos de partículas se advirtieron bandas de absorbancia en torno a 1254 cm⁻¹ y 1047 cm⁻¹ correspondientes con los modos de flexión del enlace CH₂ y del estiramiento del enlace C-C, respectivamente.

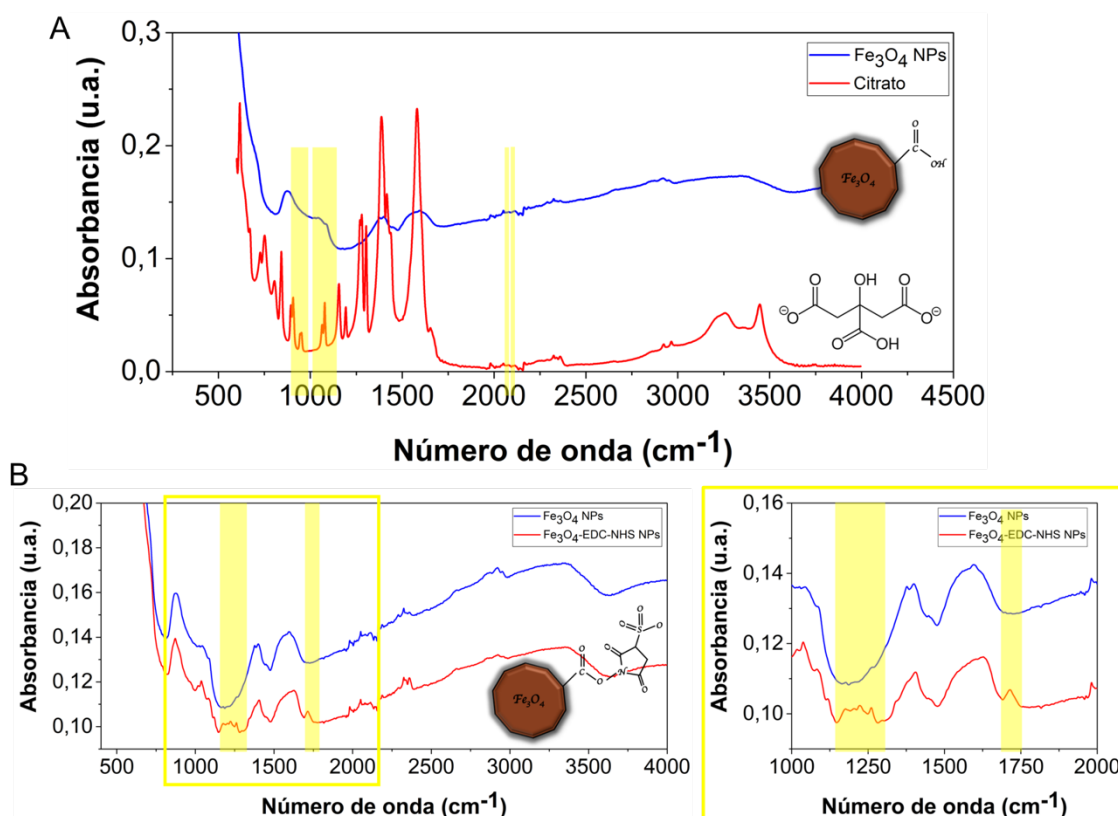


Figura 6.13. Espectros FTIR de A) citrato puro y Fe₃O₄NPs sintetizadas; B) Fe₃O₄NPs antes y después de la funcionalización con EDC y NHS; c) Ampliación de la zona del espectro con las bandas de absorción características del enlace amida formado tras la funcionalización.

Las medidas de potencial zeta de ambos tipos de NPs a pH fisiológico (pH 7), revelaron una carga superficial negativa de $-29,4 \pm 1$ mV para las Fe₃O₄NPs (debido a los grupos carboxilo expuestos en la superficie, similar a otras partículas de hierro recubiertas con citrato ya reportadas³⁰¹) y de $16,14 \pm 1,04$ mV para las Fe₃O₄-EDC-NHS-NPs (debido al grupo amino expuesto en su superficie). Esta inversión de la carga de negativa a positiva tras la funcionalización de las partículas, indica nuevamente la correcta funcionalización superficial de las mismas con el EDC y el NHS. La cantidad de EDC y NHS presente en la superficie de las partículas se cuantificó por análisis TGA. La **figura 6.14** indica que, en el caso de las partículas desnudas, la cantidad de materia

orgánica se correspondía con un 5 % de la masa de las partículas. Esta pérdida de peso se asocia a los grupos citrato expuesto en la superficie de las partículas. Por otro lado, cuando se realizó un análisis TGA a las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-EDC-NHS-NPs}$ se obtuvieron dos picos claros de pérdida de masa, correspondientes a un 40 % de la masa total de las partículas debido a la presencia del EDC y del NHS.

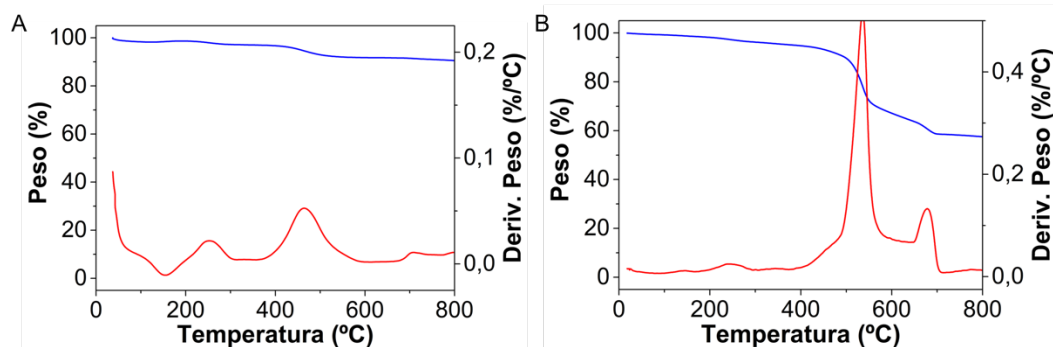


Figura 6.14. Gráficas correspondientes con el análisis de TGA realizado en las A) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ y en las B) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-EDC-NHS-NPs}$.

La curva de histéresis de las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-EDC-NHS-NPs}$ se muestra en la **figura 6.15**, evidenciándose sus propiedades superparamagnéticas esperadas, y similares a las de las partículas desnudas.²⁹⁰

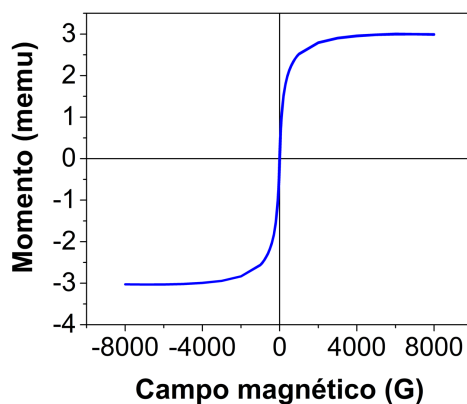


Figura 6.15. Curva de histéresis de las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-EDC-NHS-NPs}$, demostrándose sus propiedades superparamagnéticas a temperatura ambiente.

6.2.2.2. Evaluación de la estabilidad de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-EDC-NHS-NPs}$

La estabilidad de las partículas aportada por la presencia del recubrimiento con EDC y NHS se analizó por XPS tras un almacenamiento de 30 días (realizando un análisis de la composición elemental de las partículas y una evaluación del entorno atómico del Fe), así como por potencial zeta (analizando la carga superficial de las mismas). El análisis elemental de las partículas muestra, como era de esperar, la presencia de carbono, oxígeno y hierro. En concreto ambos tipos de partículas contaban

6. Exosomas y nanopartículas. Agente de imagen y diagnóstico

con un 30 % aproximadamente de Fe. Las partículas funcionalizadas además contenían desde un 0,5 a un 0,93 % de N (**tabla 6.1**).

Tabla 6.1. Composición elemental de las Fe₃O₄NPs y Fe₃O₄-EDC-NHS-NPs obtenidos por XPS tras 30 días de almacenamiento a temperatura ambiente.

	Tiempo (d)	B.E. (eV) % atómico				N/Fe
		C 1s	O 1s	Fe 2p	N 1s	
Fe₃O₄NPs	0h	284.9 25.16%	530.1 45.02%	710.5 29.82%		
	24h	284.9 25.23%	530.1 46.07%	710.5 28.71%		
	7 días	284.9 24.55%	530.1 45.49%	710.6 29.96%		
	10 días	284.9 25.23%	530.1 45.59%	710.6 29.18%		
	20 días	284.9 26.49%	530.1 45.08%	710.5 28.43%		
	30 días	284.9 24.65%	530.2 45.56%	710.8 29.79%		
Fe₃O₄-EDC-NHS-NPs	0h	284.9 22.30%	530.2 46.24%	710.7 30.95%	400.7 0.50%	0,0162
	24h	284.9 22.43%	530.0 45.71%	710.6 31.22%	400.9 0.64%	0,0205
	7 días	284.9 22.68%	530.1 46.76%	710.6 29.81%	400.8 0.74%	0,0248
	10 días	284.9 23.01%	530.1 46.79%	710.7 29.44%	400.9 0.75%	0,0255
	20 días	284.9 24.98%	530.2 46.69%	710.7 27.48%	400.9 0.85%	0,0309
	30 días	284.9 24.81%	530.3 45.37%	710.7 28.89%	400.0 0.93%	0.0322

El análisis de XPS para el Fe²⁺ mostrado en la **figura 6.16** y la **tabla 6.2**, revela una composición de las partículas recién sintetizadas típica de la magnetita, con una abundancia atómica de un 33 % y de un 66 % de Fe²⁺ y Fe³⁺, respectivamente.

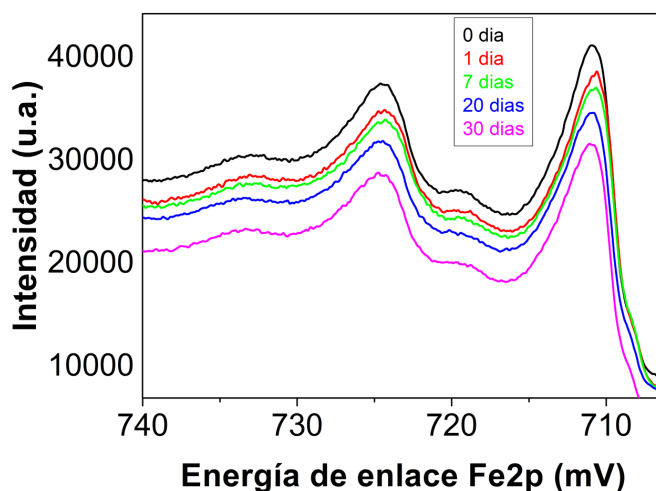


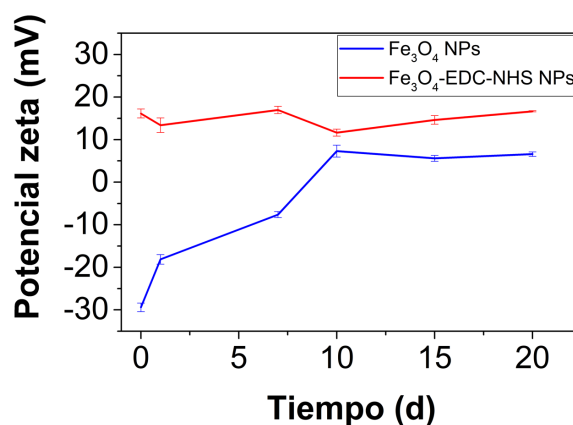
Figura 6.16. Análisis por XPS del estado del Fe2p en las Fe₃O₄-EDC-NHS-NPs durante 30 días.

Tabla 6.2. Análisis por XPS del estado del Fe 2p_{3/2} en las Fe₃O₄-EDC-NHS-NPs durante 30 días.

	Fe ⁰	Fe ²⁺		Fe ³⁺	
	3/2	3/2	Sat.	3/2	Sat.
0h		710.4 33%	713.7	711.1 66%	719.3
24h		709.9 37%	713.7	711.2 63%	718.9
7 días		710.4 41%	713.9	711.5 59%	719.0
10 días		710.3 39%	714.1	711.7 61%	719.2
20 días		710.4 42%	714.0	711.9 58%	719.2
30 días		710.3 41%	714.1	711.7 59%	719.3

En el rango de energías de enlace entre 700 y 740 eV, se observan unos picos dobles con energías de unión de 710,6 y 724,8 eV correspondientes con las energía de enlace del Fe2p_{3/2} y Fe2p_{1/2}. Además, cabe destacar la presencia de un pico alrededor de 719 eV, típico de la fase de magnetita.³⁰² Sin embargo, es posible observar que, conforme el tiempo tras la síntesis avanza, la cantidad de Fe²⁺ incrementa gradualmente mientras que la cantidad de Fe³⁺ disminuye. Esta reducción progresiva del Fe³⁺ se atribuye a la presencia del grupo amida tras su funcionalización con el EDC-NHS.³⁰³

El análisis de la carga superficial indica que la carga de las partículas sin funcionalizar cambia de negativa a positiva pasados 7 días de su síntesis. Esto sugiere la pérdida de los grupos citrato de alrededor la partícula y, por tanto, la pérdida de la capa responsable de la estabilización de las mismas. Por lo contrario, el análisis de la carga superficial de las partículas conjugadas al EDC y al NHS muestra como la carga permanece constante a lo largo de 20 días (alrededor de 15 mV), evidenciando la estabilidad de las partículas funcionalizadas con el EDC y con el NHS, comparado con las partículas desnudas (**figura 6.17**).

**Figura 6.17.** Estudio de la carga superficial de las Fe₃O₄-EDC-NHS-NPs durante 30 días.

6.2.2.3. Unión de anti-CD9 a las MNPs

La correcta inmovilización de los anticuerpos a la superficie de las partículas es clave para obtener partículas funcionales y operativas en el microdispositivo. Dado que las Fe_3O_4 -EDC-NHS-NPs presentaron una buena estabilidad coloidal durante al menos 20 días, se conjugaron covalentemente con un anticuerpo comercial anti-CD9.

Con el objetivo de estudiar la eficacia en la conjugación de los anticuerpos anti-CD9 a las partículas, se formaron complejos con varios ratios de NPs:Ab (p:p), manteniéndose constante siempre la cantidad de anticuerpo (1 μg) y aumentando la cantidad de partículas desde 50 a 200 μg . Los resultados de medida de absorbancia a 280 nm por espectrofotometría de UV-VIS revelan que la cantidad de anti-CD9 libre en el sobrenadante (anticuerpo no unido) disminuyó gradualmente conforme la cantidad de partículas aumentaba como consecuencia de la conjugación del anticuerpo a las partículas funcionalizadas con el EDC y el NHS, mediada por la afinidad de los grupos amino presentes en los residuos de lisina (localizados preferentemente en la región constante de la cola de los anticuerpos). De hecho, se observó un pico de absorbancia a 280 nm (correspondiente a la cantidad de anticuerpo libre sin unir en el sobrenadante) cuando el anticuerpo se puso en contacto con la cantidad más baja de NPs (ratio 50:1), mientras que para el ratio máximo (200:1) este pico desapareció, indicando que prácticamente todo el anticuerpo estaba conjugado a la superficie de las partículas (**figura 6.18**).

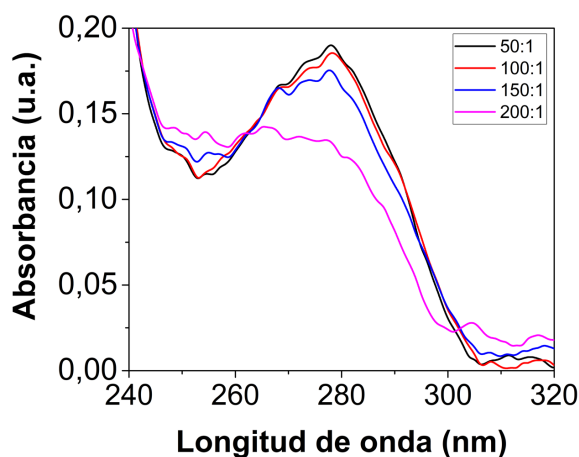


Figura 6.18. Espectro de absorción del anticuerpo presente en el sobrenadante de los complejos de Fe_3O_4 -EDC-NHS-NPs:antiCD9.

Conocida la cantidad de anticuerpo puesta en contacto inicialmente y el anticuerpo libre presente en el sobrenadante, se obtuvo el porcentaje de anticuerpos unidos (**tabla 6.3**), apreciándose claramente un aumento gradual de la cantidad de anticuerpos conjugados a la superficie de las partículas conforme se incrementaba la

cantidad de partículas. Saha y cols., demostraron que en la conjugación de anticuerpos en la superficie de las NPs llega un punto crítico donde la cantidad de anticuerpos funcionalmente activos disminuye conforme aumenta la cantidad de anticuerpo conjugado debido a la presencia de impedimentos estéricos, con el correspondiente decrecimiento de la cantidad de antígenos capturados.³⁰⁴ En vista de estos resultados, se eligió 100:1 como el ratio óptimo para utilizar las Fe₃O₄-EDC-NHS-NPs:antiCD9 en la captura magnética de los exosomas en el microdispositivo.

Tabla 6.3. Porcentaje de anticuerpo unido a las partículas en los diferentes ratios testados obtenido a partir de los resultados de absorbancia.

Fe ₃ O ₄ -EDC-NHS NPs-CD9 (p:p)	Anticuerpo unido (%)
200:1	94,9 %
150:1	91,7 %
100:1	91 %
50:1	89 %

Los complejos Fe₃O₄-EDC-NHS-NPs:antiCD9 se visualizaron por AFM. En las imágenes de AFM (**figura 6.19**) se observaron en primer lugar las Fe₃O₄NPs como semiesferas de 30 a 50 nm de tamaño (resultados concordantes con las imágenes de TEM mostradas en la **figura 6.10**).

Por otro lado, se visualizaron también los anticuerpos libres, los cuales aparecen como una monocapa de partículas esféricas y homogéneas de unos 6-7 nm de altura. Finalmente, en las imágenes de AFM de partículas con anticuerpos conjugados (Fe₃O₄-EDC-NHS-NPs:antiCD9) depositados sobre la superficie de la mica, se evidenció un “core” o centro del complejo con un tamaño de unos 50 nm (compatible con las MNPs funcionalizadas) unido a unos brazos de unos 6-7 nm de altura (correspondientes a los anticuerpos unidos a la superficie de las partículas).

6. Exosomas y nanopartículas. Agente de imagen y diagnóstico

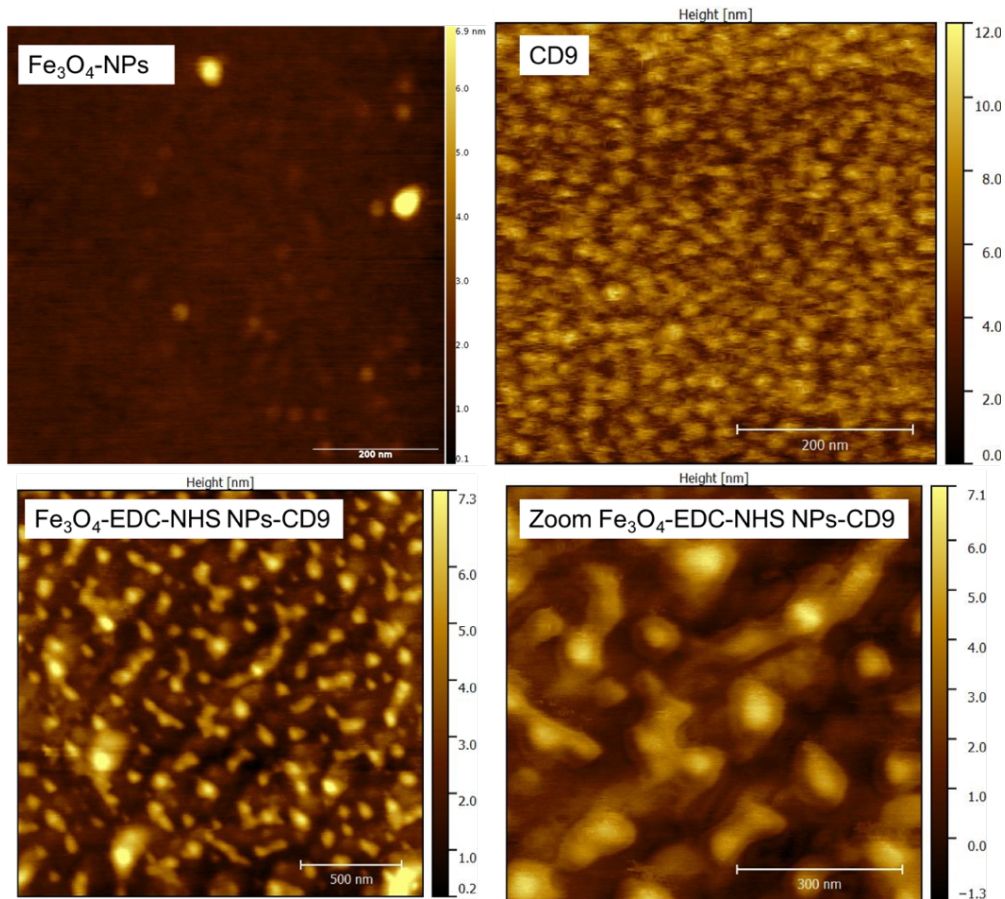


Figura 6.19. Imágenes de AFM de las partículas desnudas (Fe₃O₄NPs); del anticuerpo (CD9) y de los complejos Fe₃O₄-EDC-NHS-NPs:antiCD9.

6.2.2.4. Prueba de concepto de la captura de exosomas

A continuación, se recogen los resultados referentes a la captura de los exosomas por las MNPs tras la funcionalización con EDC-NHS y con el anticuerpo exosomal anti-CD9 previamente sintetizadas y caracterizadas.

Con el objetivo de corroborar la captura magnética de los exosomas, en primer lugar, se realizó un ensayo fuera del microdispositivo. Para ello, se pusieron en contacto 40 µg de exosomas con las Fe₃O₄-EDC-NHS-NPs:antiCD9 con dos ratios diferentes de NPs:Ab p:p (50:1 y 100:1). Parece lógico pensar que al incrementar el ratio NPs:Ab, así como al aumentar el tiempo de incubación del anticuerpo con su antígeno, la cantidad de exosomas capturada se vería incrementada. Sin embargo, se observaron únicamente ligeras diferencias (estadísticamente no significativas) (**figura 6.20.A**). Estos resultados concuerdan con los obtenidos para la cantidad de anticuerpo adsorbida en la superficie de las partículas (**tabla 6.3**), ya que cuando el ratio NPs:Ab aumenta de 50:1 a 100:1, la cantidad de anticuerpo conjugado únicamente se incrementó en un 2 % (de un 89 % a un 91 %).

6. Exosomas y nanopartículas. Agente de imagen y diagnóstico

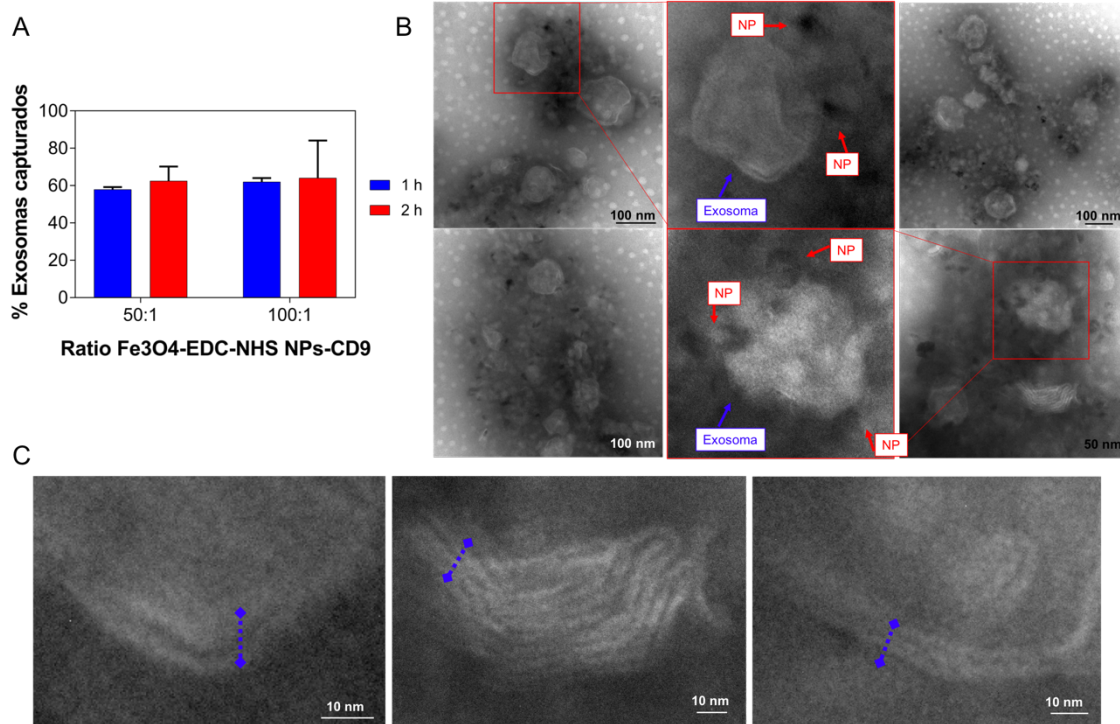


Figura 6.20. A) Porcentaje de exosomas capturados por las Fe₃O₄-EDC-NHS-NPs:antiCD9 con diferentes ratios (50:1 y 100:1) tras un tiempo de contacto de 2 horas cuantificado por el método BCA. B) Fotografías de microscopía electrónica de los complejos de partículas y exosomas capturados. En azul se indican los exosomas y en rojo las partículas. C) Ampliación de las figuras de microscopía electrónica donde es posible visualizar la doble bicapa lipídica de los exosomas.

Otro factor a tener en cuenta es la naturaleza de la interacción antígeno-anticuerpo. La unión específica de un antígeno a su anticuerpo ocurre por complementariedad espacial y por enlaces débiles no covalentes (principalmente puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, fuerzas electrostáticas y fuerzas de Van der Waals) y depende de la conformación y de la carga de ambos elementos. El reconocimiento del antígeno por su correspondiente anticuerpo ocurre en los sitios de reconocimiento localizados en la región variable del anticuerpo y cuando todos estos sitios de reconocimiento están ocupados, el anticuerpo ya ha reconocido todo el antígeno que potencialmente puede capturar, alcanzando una condición de saturación. Por tanto, considerando los resultados de la **figura 6.20.A** puede también deducirse que tras una hora de contacto entre las Fe₃O₄-EDC-NHS-NPs:antiCD9 y los exosomas, ya se capturaron todos los exosomas posibles (hasta un 60 % de los presentes inicialmente en la muestra). La **figura 6.20.B** recoge imágenes de microscopía electrónica representativas de complejos formados por las Fe₃O₄-EDC-NHS-NPs:antiCD9 y los exosomas tras incubarse durante 1 hora. Pueden observarse complejos formados por los exosomas (aparecen marcados en azul, visualizados como vesículas orgánicas con forma esférica con un diámetro de 100 nm aproximadamente y rodeadas de la doble bicapa lipídica característica), unidos a las MNPs (indicadas en rojo y de mayor densidad

electrónica que los exosomas, de aproximadamente 25 nm de diámetro unidas a la superficie de las vesículas). La **figura 6.20.C** muestra un detalle de las imágenes de microscopía electrónica en las que puede claramente visualizarse la doble bicapa lipídica de los exosomas (con un espesor de 5 nm) capturados por las Fe₃O₄-EDC-NHS-NPs:antiCD9.

6.2.2.5. Captura de exosomas en el microdispositivo

Una vez diseñado el microdispositivo y optimizada la captura magnética de los exosomas, se llevó a cabo el reconocimiento y la separación de los mismos en el interior del microdispositivo. Como ya se ha indicado, se utilizaron escenarios de complejidad creciente, desde exosomas dispersos en una disolución de PBS, hasta los presentes en sangre total de pacientes, como se muestra en la **figura 6.21.A**.

Es importante recordar que la preparación de la rejilla para visualizar las muestras por TEM, incluye una etapa de secado, lo cual puede dar lugar a una deposición de las partículas en la rejilla de forma irregular y a la formación de agregados de NPs y exosomas. Este fenómeno puede explicarse por la compresión capilar que ocurre en la gota a medida que se va evaporando.³⁰⁵ No obstante, la calidad de las imágenes es suficientemente alta como para permitirnos verificar la presencia de complejos de exosomas capturados en el interior del microdispositivo unidos a las MNPs. En alguno de los complejos presentes en estas imágenes pudo observarse inequívocamente la doble bicapa lipídica característica de los exosomas (**figura 6.21.B**), con un espesor de 5 nm, en concordancia con lo indicado en bibliografía.³⁰⁶

Tras la captura de los exosomas en el microdispositivo, se cuantificó la cantidad de CD63 (y por tanto de exosomas) presente en los complejos capturados mediante un ensayo ELISA (expresado en cantidad de partículas). La tabla presente en la **figura 6.21.C** muestra la cantidad de exosomas capturados a partir de las muestras de PBS, FBS y sangre procesadas en el microdispositivo. El ELISA frente a CD63 indicó que aproximadamente en todas las muestras se capturaron 2×10^{10} exosomas. La constancia de esta cifra se atribuye a que ésta es la máxima cantidad de exosomas que pueden capturarse por las NPs introducidas (ya que una vez que se ocupan todos los sitios de unión del anticuerpo CD9, ya no es posible reconocer e inmovilizar más cantidad de antígeno, es decir, de exosomas). Por lo contrario, al procesar una muestra de sangre entera en el microdispositivo junto con Fe₃O₄-NPs sin funcionalizar con el anticuerpo (control negativo), las fotografías de TEM y el ensayo ELISA frente a CD63 demostraron únicamente la presencia de las MNPs y materia orgánica asociada, sin presencia de exosomas.

6. Exosomas y nanopartículas. Agente de imagen y diagnóstico

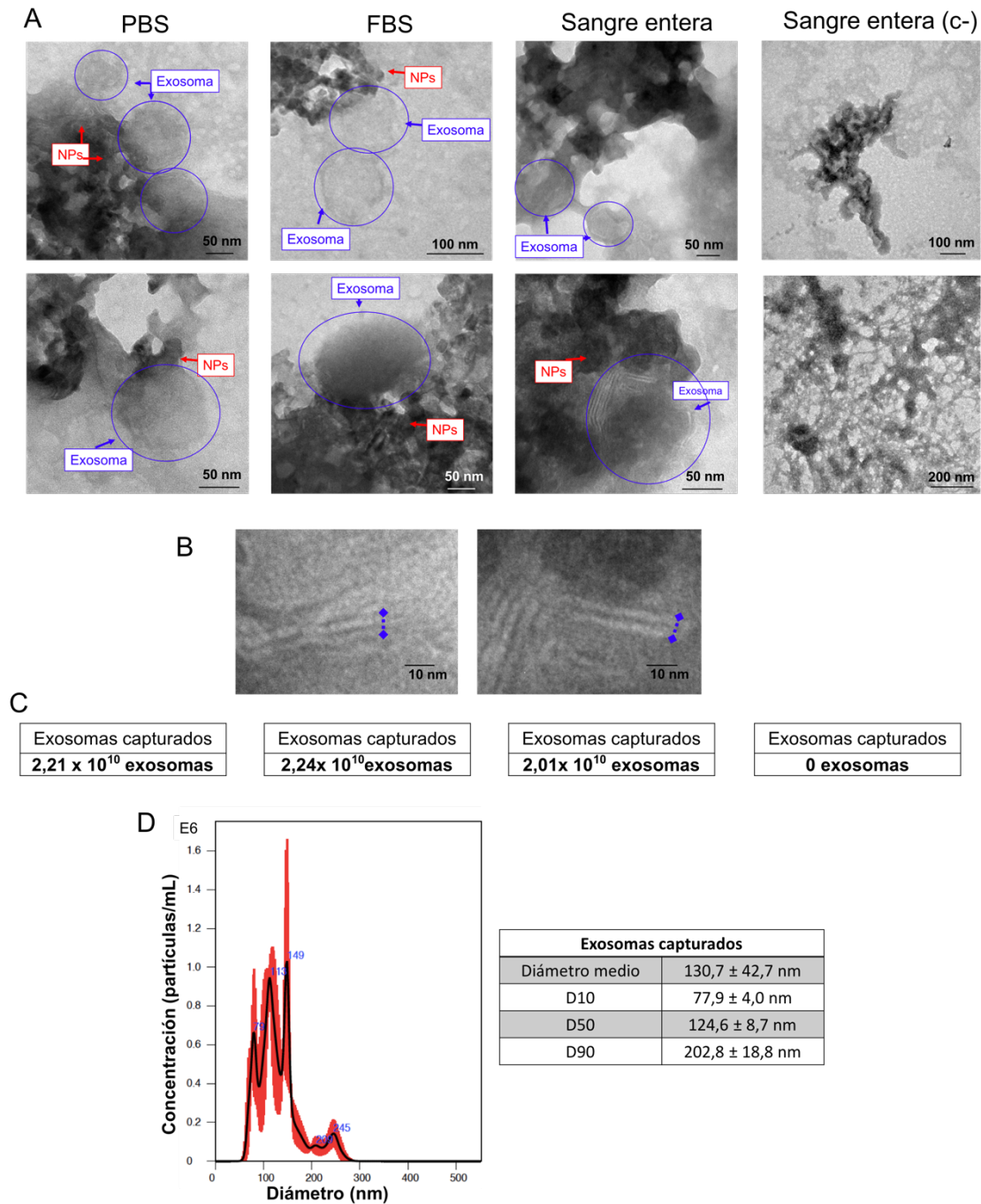


Figura 6.21. A) Fotografías de microscopía electrónica de los complejos de partículas y exosomas capturados en el interior del microdispositivo a partir de PBS, FBS y sangre periférica (incluido un control negativo que contenía partículas sin funcionalizar con el anticuerpo). En azul se indican los exosomas y en rojo las partículas. B) Ampliación de las figuras de microscopía electrónica donde es posible visualizar la doble bicapa lipídica de los exosomas. C) Resultados de la cantidad de exosomas capturados (expresado en cantidad de partículas/mL obtenidos a partir de un ELISA frente a CD63. D) Diagrama NTA de los complejos de exosomas y partículas obtenidos en la inmunocaptura.

La concentración y el diámetro de los exosomas capturados a partir de la muestra más compleja (sangre entera) se estimó por NTA (**figura 6.21.D**). Se obtuvo un diámetro medio de $130,7 \pm 42,7$ nm, en acuerdo con el tamaño que tendrían los

complejos de MNPs (aproximadamente 25 nm) conjugadas a los exosomas (100 nm) capturados en el imán del microdispositivo. Demostrada la funcionalidad del microchip para capturar exosomas a partir de sangre periférica total, este dispositivo se empleó para aislar exosomas de sangre periférica de pacientes con CP, con el objetivo de demostrar el potencial de esta herramienta como método de diagnóstico temprano y monitorización de este tumor a través del análisis de la proteína tumoral CA19-9 presente en los exosomas (CA19-9 exosomal). Para ello, se capturaron los exosomas presentes en la sangre de estos pacientes y posteriormente se realizó un análisis de la expresión de la proteína CA19-9 en estos exosomas a través de otro ELISA frente a esta proteína. La **figura 6.22.A** muestra que los niveles de CA19-9 exosomal capturados a partir de sangre total, fueron significativamente más altos en pacientes con cáncer comparados con los niveles de esta proteína obtenidos en las vesículas capturadas a partir de sangre total de donantes sanos (se obtuvieron valores incluso cuatro veces superiores).

La robustez del análisis exosomal de CP se deduce de la tabla de la **figura 6.22.B**: comparado con los donantes sanos, los niveles de CA19-9 exosomal se encontraban aumentados claramente en todos los pacientes con CP analizados. Sin embargo, la ventaja y la potencial aplicación del análisis basado en exosomas como agente de diagnóstico de CP frente al análisis de CA19-9 en suero libre se pone de manifiesto en el caso del paciente 2 (paciente falso negativo). En este paciente, a pesar de tener un adenocarcinoma en la cola del páncreas, los niveles de CA19-9 libre en suero se encuentran en el rango normal (menores de 37 U/mL) dificultándose su seguimiento y monitorización. Sin embargo, los niveles de CA19-9 exosomal presente en los exosomas de este paciente eran significativamente más altos y comparables a los del resto de pacientes evaluados.

Los resultados obtenidos en esta sección amplían los mostrados en el trabajo de Javeed y *co/s.*, quienes demostraron que las vesículas extracelulares en los pacientes con CP eran predominantemente exosomas y que todos ellos expresaban CA19-9. También demostraron que los exosomas de pacientes control no presentaban niveles significativamente altos de CA19-9. Este estudio también reveló que la cantidad de exosomas presentes en la sangre periférica de pacientes con CP era significativamente mayor comprando con los encontrados en sangre periférica de donantes sanos, hecho que sugiere que esta diferencia se debe a la producción de estos exosomas tumorales enriquecidos en CA19-9 por parte de las células tumorales pancreáticas.³⁰⁷ El procedimiento empleado en este trabajo implicó un abordaje muy laborioso basado ciclos de ultracentrifugación para purificar las vesículas, un método de aislamiento que

compromete la integridad de los exosomas así como la reproducibilidad del método. Por lo contrario, el microdispositivo presentado y evaluado en esta sección, permite capturar exosomas a partir de sangre entera de manera sencilla, por personal sin formación específica, facilitando su traslación a la clínica.

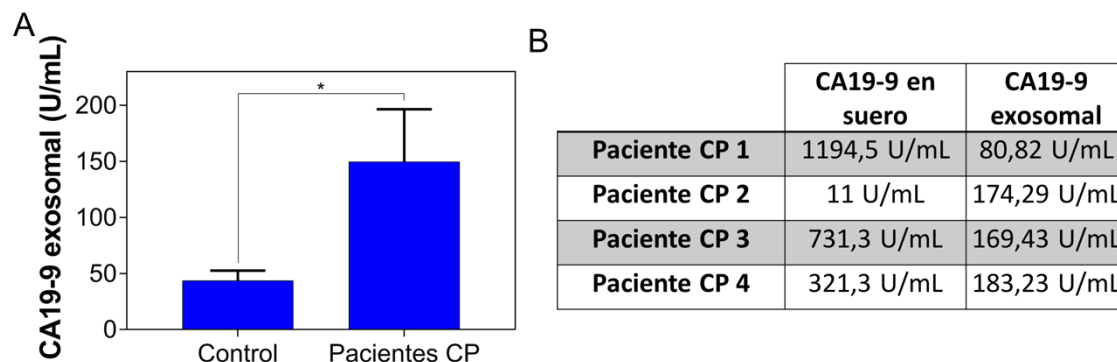


Figura 6.22. A) Gráfica que representa los valores de la proteína tumoral CA19-9 en los exosomas capturados en el microdispositivo tanto en sangre proveniente de pacientes con CP como de donantes sanos. B) Valores de CA19-9 libre en suero y CA19-9 exosomal de los pacientes con CP.

La prueba de concepto para demostrar la funcionalidad de este microdispositivo se ha realizado en muestras de pacientes con CP. Sin embargo, este dispositivo podría, en principio, usarse para el diagnóstico y la monitorización de cualquier otra patología, sencillamente cambiando el anticuerpo de interés.

6.2.3. Conclusiones de esta sección

El aislamiento de exosomas tumorales y su posterior análisis, presentan alto potencial para aplicaciones de diagnóstico y medicina personalizada. Sin embargo, los métodos convencionales de purificación de exosomas requieren equipos costosos y personal altamente cualificado. Además, frecuentemente dan lugar a poblaciones de exosomas con grados de pureza bajos, lo que dificulta su empleo como agentes de diagnóstico. El microdispositivo que se presenta en esta sección permite la captura de exosomas y su separación de diferentes fluidos a través de una captura magnética de inmunoafinidad. Esta plataforma se ha empleado para aislar exitosamente exosomas derivados de CP a partir de sangre entera periférica sin necesidad de pretratamiento. Los resultados del análisis de la proteína CA19-9 exosomal muestran una alta sensibilidad de detección en comparación con los niveles de proteína CA19-9 libre en el suero de dichos pacientes. Este procedimiento podría adaptarse al diagnóstico de otras patologías a través del análisis de proteínas características de las mismas que se sobreexpresaran o enriquecieran en los exosomas del paciente.

6.3. PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} para seguimiento y visualización de células en cultivo

En los últimos años, la nanotecnología ha dado lugar a una nueva generación de herramientas que permiten visualizar células vivas en su entorno fisiológico. Se han desarrollado NPs versátiles capaces de realizar varias modalidades de imagen al mismo tiempo (p.ej. ultrasonidos, CT y MRI simultáneamente).³⁰⁸ Sin embargo, una de las principales limitaciones del uso de NPs como agentes de imagen es su toxicidad y el desencadenamiento de rutas apoptóticas, así como su potencial exocitosis y consecuente eliminación.³⁰⁹ En este último caso, las partículas serían fagocitadas por los macrófagos y se perdería el seguimiento de la célula de interés. Algunas de las características de las AuNPs que las convierten en agentes de imagen atractivos son: alto número atómico, facilidad de síntesis, elevada biocompatibilidad, propiedades ópticas para reflejar la luz incidente, susceptibilidad de funcionalizar su superficie con numerosos grupos funcionales y polímeros, e incluso la versatilidad de morfologías y tamaños con las que pueden ser sintetizadas.³¹⁰ Todas estas características determinarán en el grado de internalización por parte de las células diana, y en consecuencia, su potencial visualización dentro de las mismas. Para dotar las partículas con selectividad y especificidad hacia células de interés, algunos trabajos han publicado la funcionalización de las AuNPs con ligandos, anticuerpos o nucleótidos. Como alternativa, en esa sección se explotan las capacidades de direccionamiento de los exosomas incluyendo PEG-HGNs en su interior, y se estudia su posible empleo de las NPs como agentes de contraste para CT.

6.3.1. Experimental

6.3.1.1. PEG-HGNs-Exos para seguimiento celular por microscopía confocal

Para probar el potencial de los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} como agentes de imagen y seguimiento celular, estos se visualizaron el interior de células diana en cultivos por microscopía confocal (capítulo 3). En primer lugar, se sembraron las células B16-F10 sobre cubreobjetos previamente depositados en una placa de 24 pocillos tal y como se ha detallado en capítulos anteriores (**tabla 3.5**). Pasadas 24 horas, se añadieron 10 μ g de PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} y se incubaron durante 2, 4, 6, 8, 24 y 32 horas para encontrar el tiempo óptimo de internalización. Los filamentos de actina del citoplasma se marcaron con faloidina-488 y los núcleos con DRAQ5. Los aglomerados de PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} se observaron directamente por reflexión de la luz incidente. Para corroborar que dichas vesículas se encontraban en el interior celular (citósol), se realizaron proyecciones ortogonales provenientes de adquirentes en dirección zeta.

6.3.1.2. Visualización de PEG-HGNs en tejido muscular *ex vivo*

El potencial de las PEG-HGNs como agente de imagen se comprobó *ex vivo* utilizando tejido muscular de pollo como sucedáneo del tejido a analizar. Se inyectaron 100 μg de PEG-HGNs con una jeringuilla en el interior del tejido muscular y posteriormente se visualizaron por CT en el equipo Imagen Nano SPECT-CT, perteneciente al Servicio Científico Técnico Imagen Médica y Fenotipado del IACS. Como control negativo, se administró intramuscularmente únicamente PBS.

6.3.2. Resultados y discusión

6.3.2.1. PEG-HGNs-Exos para seguimiento celular por microscopía confocal

Las propiedades ópticas de reflexión de las PEG-HGNs encapsuladas en el interior de los Exos^{B16-F10} nos permitieron visualizar las agrupaciones de exosomas en el interior de células directamente por la reflexión de la luz incidente (ex/em 488/490 nm) bajo un microscopio confocal. Las imágenes mostradas en la **figura 6.23.A** de las células B16-F10 incubadas con los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} durante 2, 4, 6, 8, 24 y 32 h muestran claramente la presencia de las partículas en el interior del citoplasma.

El análisis semicuantitativo de la fluorescencia de las NPs en el interior celular, indica como la cantidad de partículas dentro del citoplasma, y por tanto su potencial como agente de imagen, es significativamente mayor pasadas las 6 h de la incubación (**figura 6.23.B**). Las agrupaciones de partículas se observaron en el interior del citoplasma incluso tras 32 h de haberlas puesto en contacto con las células.

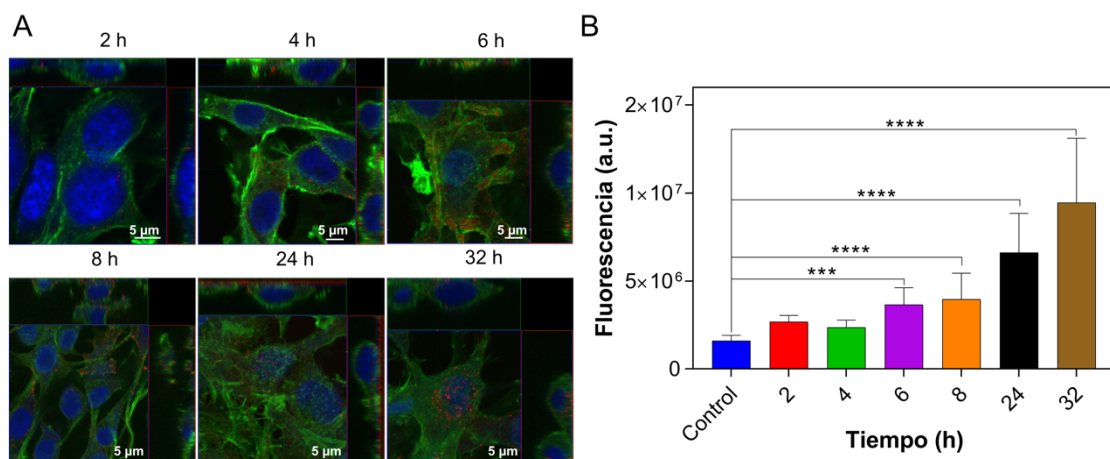


Figura 6.23. A) Imágenes de microscopía confocal de células B16-F10 incubadas con PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} durante 2, 4, 6, 8, 24 y 32 h. Las agrupaciones de las partículas se visualizan en color rojo. B) Semicuantificación de la señal de las partículas de las diferentes imágenes de la izquierda.

6.3.2.2. Visualización de PEG-HGNs en tejido muscular *ex vivo*

Para evaluar el potencial de las PEG-HGNs como agentes de imagen se realizaron ensayos preliminares utilizando tejido muscular de pollo. La **figura 6.24** recoge imágenes del tejido muscular visto desde tres perspectivas (sagital, coronal y lateral) inoculado con PBS a modo de control (**figura 6.24.A**) y con 100 μ g de PEG-HGNs en PBS (**figura 6.24.B**).

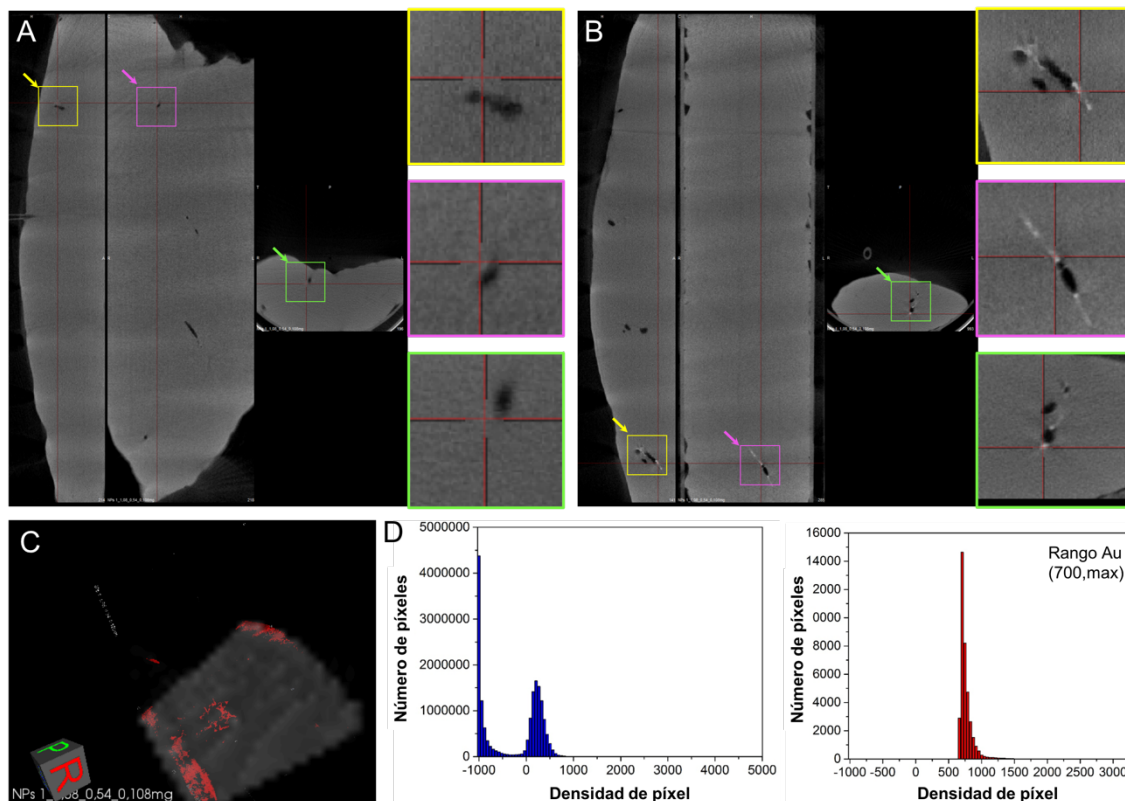


Figura 6.24. A) Tejido muscular de pollo tratado con PBS. B) Tejido muscular de pollo tratado con 100 μ g de PEG-HGNs. C) Reconstrucción 3D del tejido muscular marcando en rojo los píxeles con una densidad superior a 700. En el centro del tejido pueden observarse las NPs. D) Diagramas de densidad de píxel completo (figura izquierda) y únicamente del oro (figura derecha).

Como demuestran los zooms realizados en las adquisiciones de las tres perspectivas, en el caso del control (sólo PBS), únicamente se visualizó el aire introducido por la jeringuilla al realizar la inoculación (en color negro). Por su parte, los zooms de la **figura 6.24.B** demuestran la aparición de píxeles blancos (con un mayor coeficiente de atenuación a los rayos X) debido a la presencia del oro de las PEG-HGNs justo en la zona de inyección de las mismas. En función del coeficiente de atenuación a los rayos X, los valores de densidad de los píxeles de una imagen de CT varían entre -1000 y 1000; y al aire se le asigna un valor de -1000 mientras que al agua de 0. Valores por encima de 700 o 1000 se corresponden con una gran atenuación a los rayos X. La **figura 6.24.C** recoge una reconstrucción en 3D del tejido muscular inoculado con las

PEG-HGNs en la cual se marcaron en rojo todos los píxeles con un valor superior a 700. Los gráficos de la **figura 6.24.D** muestran la densidad de todos los píxeles de la muestra, observándose que la gran mayoría se correspondían con aire y agua. Sin embargo, la gráfica de la derecha demuestra la presencia de píxeles con una densidad igual o incluso superior a 1000 unidades, correspondiente con la presencia de Au proveniente de las PEG-HGNs.

6.3.3. Conclusiones de esta sección

Los resultados obtenidos en esta sección demuestran el potencial de los PEG-HGNs-Exos como potenciales agentes de imagen para visualizar células vivas en cultivo incluso pasadas 32 horas de su administración. Los datos expuestos en el ensayo relativo a la visualización de las partículas por CT en tejido muscular son aún preliminares y es necesario realizar un estudio más profundo para determinar las dosis necesarias y los umbrales de sensibilidad. Sin embargo, evidencian que las PEG-HGNs encapsuladas en los exosomas son susceptibles de ser visualizadas por CT y abren la puerta al uso de estos vectores como vehículos de las citadas NPs en aproximaciones diagnósticas de imagen por dicha técnica.

6.4. Exosomas cargados con *Perfecta* para imagen por ^{19}F -MRI

La monitorización por MRI representa una de las herramientas más utilizadas para visualizar tejidos *in vivo* con gran resolución y de gran calidad. Una imagen de MRI se obtiene gracias a la diferencia en los tiempos de relajación de los núcleos de hidrógeno con diferentes entornos atómicos presentes en el organismo cuando estos interactúan con un campo magnético externo. Dada la gran cantidad de agua que se encuentra circulando por los diferentes tejidos, las diferentes propiedades de relajación de sus iones ^1H han sido explotadas en la clínica para proporcionarnos información tanto fisiológica como anatómica. Sin embargo, a menudo esta resolución anatómica no es lo suficientemente buena y se necesita usar agentes de contraste para maximizarla. Uno de estos agentes de contraste son las SPIONs, que incluso ya se han combinado con exosomas para realizar MRI *in vivo* en modelos animales.^{114,117} Sin embargo, los agentes de contraste existentes presentan ciertas limitaciones: 1) se necesitan tiempos de adquisición largos, y 2) debido a la baja sensibilidad del ^1H se requieren grandes cantidades de contraste para mejorarla, lo cual puede desencadenar problemas de toxicidad.³¹¹ Una posible solución estaría en el uso de una modalidad alternativa de MRI utilizando átomos heteronucleares en combinación con el ^1H como por ejemplo ^{13}C , ^{23}Na , ^{31}P o ^{19}F . De entre todos ellos, el ^{19}F reúne una serie de características que lo

convierten en el más prometedor.³¹² Además de sus excelentes propiedades magnéticas, hay que destacar que únicamente está presente en los dientes y, en menor medida, en los huesos del cuerpo humano, por lo que una sonda conteniendo átomos de F no encontraría interferencias con el F nativo ya presente. Pero, además, se encuentra en forma sólida y tiene un tiempo de relajación T2 muy pequeño, lo que generaría muy pocas interferencias y muy poco ruido de fondo en las adquisiciones MRI. Sin embargo, con el fin de evitar problemas de toxicidad, es necesario administrar dosis bajas de ^{19}F . Hasta la fecha, se han desarrollado múltiples agentes fluorinados, entre los que destacan los compuestos perfluorocarbonos (PFC) y perfluoropolieters (PFPE). En 2014, Resnati y cols., desarrollaron una molécula superfluorinada denominada *Perfecta*, la cual se caracteriza por presentar un único pico de resonancia muy definido, estrecho y con gran intensidad, así como excelentes tiempos de relajación T1 y T2. Sin embargo, a pesar de que esta molécula tiene propiedades únicas como elemento de imagen por ^{19}F -MRI, también tiene ciertas limitaciones, principalmente asociadas a su alta hidrofobicidad. Este carácter hidrofóbico implica la necesidad de usar emulsiones, agentes surfactantes como pluronic o colato, así como partículas poliméricas (p.ej. PLGA, poli (oligo (etilenglicol) metil éter metacrilato (POEGMA)) para poder vehiculizarla en el torrente sanguíneo.

Considerando las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los exosomas, en esta sección se estudia su empleo como herramienta para vehiculizar la molécula de *Perfecta* a células y tejidos diana (tumores) de forma que puedan ser visualizados por ^{19}F -MRI. En concreto, se han empleado los exosomas derivados de células B16-F0 y mMSCs cargados con la molécula de *Perfecta* descritos y caracterizados en el capítulo 4 (*Perfecta*-Exos^{mMSCs} y *Perfecta*-Exos^{B16-F0}).

6.4.1. Experimental

6.4.1.1. Imagen ^{19}F -MRI ex vivo

El MRI de los *Perfecta*-Exos^{mMSCs} y *Perfecta*-Exos^{B16-F0} se realizó por el equipo de la Dra. Francesca Baldelli Bombelli de la Universidad Politécnica de Milán utilizando un escáner 7 Tesla (Bruker-Biopspin) localizado en el IRCCS Ospedale San Raffaele de Milán usando una bobina de radiofrecuencia $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ de doble conversión para excitación y recepción. Además, se obtuvieron imágenes Phantom para evaluar el correcto funcionamiento del equipo de resonancia. La relación señal a ruido (SNR) se calculó como el ratio de la intensidad media de la señal de cada muestra dividido por la desviación estándar del ruido de fondo. La emulsión de *Perfecta* se utilizó como

referencia a dos concentraciones diferentes (Ref 1 y Ref 2; 1 y 2×10^{19} átomos/mL, respectivamente).

6.4.1.2. Citotoxicidad metabólica

La toxicidad de los *Perfecta*-Exos de ambas líneas celulares se comprobó por el método Alamar Blue ya descrito. En este caso, se añadieron los exosomas a las células a diferentes concentraciones: 2,8; 1,4; 0,7; 0,35; 0,175; 0,088 y 0,044 μg exos/mL y se dejaron incubar durante 24, 48 y 72 horas.

6.4.1.3. Visualización en cultivos celulares por microscopía confocal

Los *Perfecta*-Exos se visualizaron en el interior celular por microscopía confocal. Para ello se sembraron células B16-F10 y mMSCs en cubreobjetos depositados sobre placas de 24 pocillos tal y como se ha descrito anteriormente (capítulo 3). Pasadas 24 horas, las células cultivadas se trataron con 5 μg de *Perfecta*-Exos^{B16-F10} y *Perfecta*-Exos^{mMSCs} (ambos fluorescentes) durante 6 h. Se realizaron adquisiciones en dirección Z para la realización de proyecciones ortogonales con el objetivo de verificar que los exosomas estaban en el interior del citoplasma de las células. Una vez adquiridas las imágenes, se buscaron los planos de máxima intensidad de fluorescencia de exosomas y se realizó un ensayo semicuantitativo para estimar la cantidad de exosomas presentes en cada línea celular.

6.4.1.4. ¹⁹F-MRI *in vivo*

La validación experimental del uso de los *Perfecta*-Exos^{mMSCs} como vectores de imagen *in vivo* se realizó por MRI en un modelo murino en las instalaciones del CICbioMAGUNE de San Sebastián (grupo Prof. Jesús Ruiz Cabello) y en las instalaciones del CIBA de Zaragoza. Los procedimientos se llevaron a cabo bajo las licencias AE-biomaGUNE1419 y PI 46/20, respectivamente. Se usaron ratones hembra B6/c *nu/nu* de 6 a 8 semanas de edad (Envigo). Los animales se estabularon y mantuvieron en condiciones estériles en jaulas autoventiladas con acceso a comida y agua estériles *ad libitum*. Tras su llegada a las instalaciones, los animales se mantuvieron durante una semana en cuarentena para su aclimatación antes de comenzar con el estudio.

En primer lugar, se indujo a la aparición de tumores subcutáneos con 200 μL de PBS conteniendo 3 millones de células HeLa en uno de los flancos de cada animal. El desarrollo tumoral fue seguido diariamente durante 15 días con un calibre, y cuando alcanzó una superficie de 0,5 cm^2 los animales se dividieron en dos grupos: ratones tratados con 1) *Perfecta*-Exos^{mMSCs} o con 2) *Perfecta* en la emulsión (con tres animales

por grupo). En los grupos que recibieron exosomas, se inyectaron 100 μL de PBS conteniendo 50 μg de *Perfecta*-Exos^{mMSCs} en la vena de la cola de los ratones *nu/nu*. Igualmente, se administraron 100 μL contiendo *Perfecta* en forma de emulsión a los ratones del grupo emulsión. En ambos grupos de animales, la cantidad de átomos de flúor administrados fue la misma ($2,51 \times 10^{19}$ átomos de flúor).

Los animales se eutanasiaron mediante inhalación de CO_2 , pasadas 48 horas y 1 semana de la administración intravenosa del vector. El tumor, los riñones, el hígado, los pulmones, el bazo, el páncreas y el corazón se aislaron para su posterior análisis histopatológico en las instalaciones del CIBA. Para ello, los órganos se fijaron con PFA al 4 % y posteriormente se transfirieron a una solución de etanol al 70 %, tras lo cual, se embebieron en parafina. Se realizaron secciones de 3 μm de cada uno de los órganos de interés y se tiñeron mediante la técnica de hematoxilina y eosina (H&E).

Por otro lado, los escaneos MRI se realizaron en las instalaciones del CICbioMAGUNE, pasadas 48 horas de la administración de los vectores. Para las medidas de ^{19}F -MRI se utilizó un imán horizontal de 11,7 T (Bruker Biospec, Ettlingen, Germany) empleando una antena de recepción y excitación volumétrica de 40 mm para la detección de $^1\text{H}/^{19}\text{F}$. Los animales fueron previamente anestesiados con exposición al 5 % de isoflurano en O_2 para posteriormente mantenerlos en torno al 2 % durante el tiempo que fueron sometidos a la sesión de imagen.

Las constantes vitales de los animales como la temperatura y la respiración se monitorizaron en todo momento empleando sensores de respiración y sondas rectales de temperatura. Para el mantenimiento de la temperatura se utilizó una manta eléctrica. La **figura 6.25** muestra a la izquierda una imagen de resonancia magnética con 1-H (^1H -MRI) coronal indicando la sección de la posición de la imagen de ^1H -MRI para escanear el área donde está el tumor. A la derecha, una imagen axial de protón indicando el tumor y el vial conteniendo *Perfecta* (indicado como “Tubo” en la imagen).

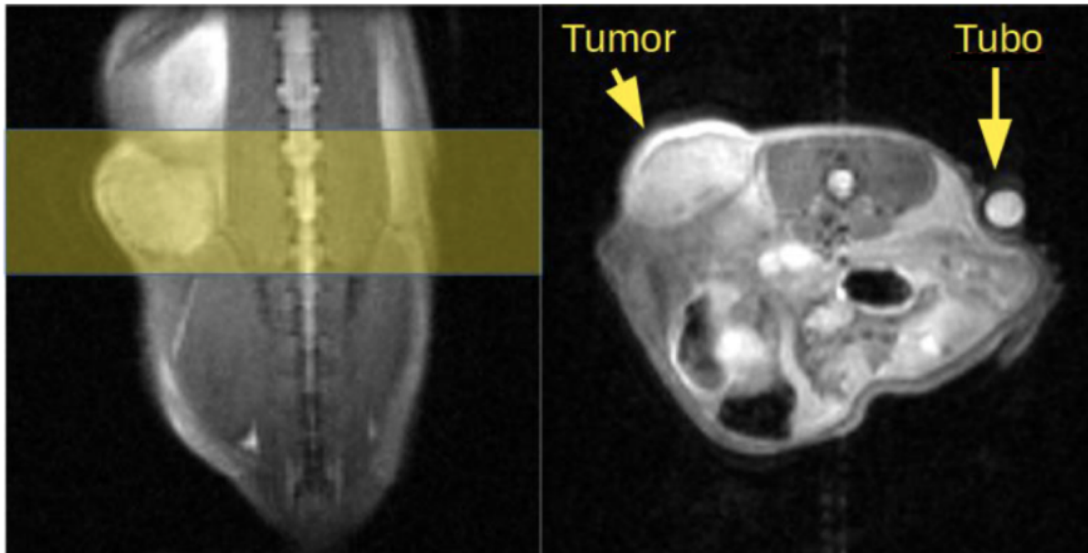


Figura 6.25. En la figura de la izquierda se muestra una imagen ^1H -MRI coronal mostrando la sección de la posición de la imagen de ^{19}F cubriendo todo el tumor. A la derecha, imagen axial de protón mostrando la posición del tumor y del vial conteniendo la solución de *Perfecta*.

6.4.2. Resultados y discusión

6.4.2.1. Imagen ^{19}F -MRI ex vivo

En la **figura 6.26.A** (imagen Phantom ^{19}F -MRI de los exosomas cargados con *Perfecta* derivados de ambas líneas celulares) se empleó la emulsión de *Perfecta* conteniendo 1 y 2×10^{19} átomos/mL como referencia (Ref 1 y Ref 2, respectivamente). Como puede observarse, los exosomas de ambas líneas celulares cargados con *Perfecta* se visualizaron claramente por ^{19}F -MRI, con una relación SNR siempre positiva en torno a 5 (**figura 6.26.B**). Estos resultados (junto con los valores de NMR, T1 y T2 mostrados en el capítulo 4) evidencian la aplicabilidad de estos nuevos vectores como agentes de imagen por ^{19}F -MRI.

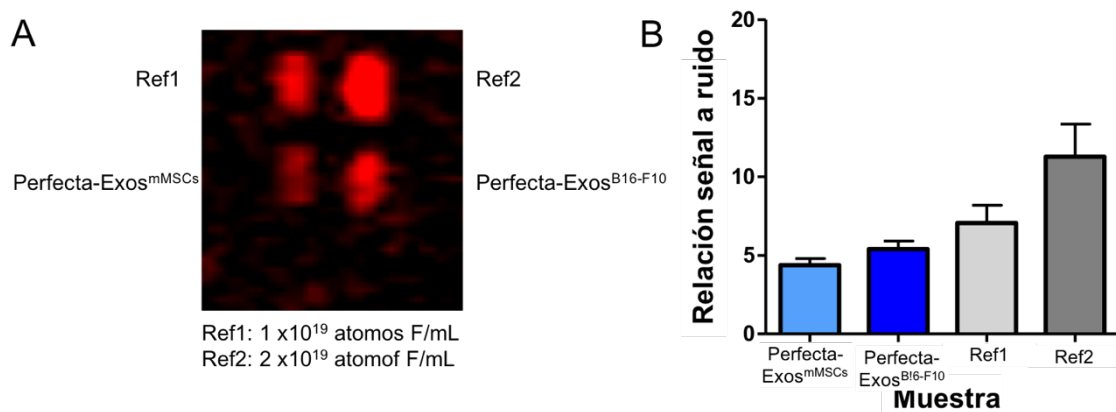


Figura 6.26. A) Imagen Phantom ^{19}F -MRI y B) Relación SNR de los exosomas derivados de ambas líneas celulares cargados con la *Perfecta*.

6.4.2.2. Citotoxicidad de los *Perfecta*-Exos

La biocompatibilidad de los *Perfecta*-Exos derivados de ambas líneas celulares se estableció mediante Alamar Blue, encontrándose que para ambos tipos de exosomas cargados con *Perfecta* no hay efecto sobre la viabilidad celular a ninguna de las dosis y tiempos de estudio ensayados (**figura 6.27**) en ninguna de las líneas celulares testadas.

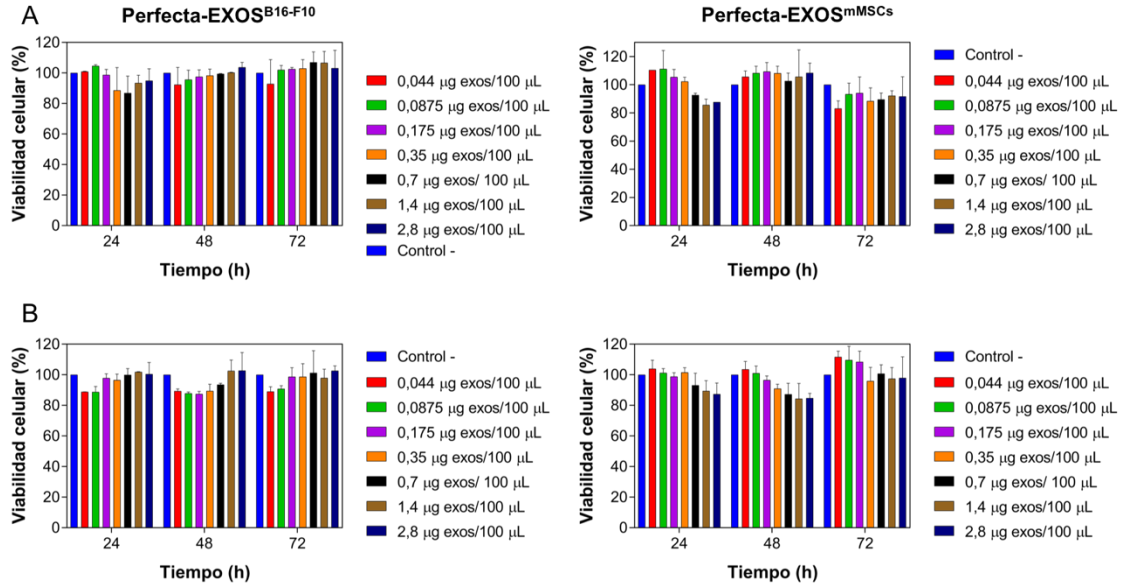


Figura 6.27. A) Citotoxicidad en células B16-F10 de los *Perfecta*-Exos^{B16-F10} (derecha) y *Perfecta*-Exos^{mMSCs} (izquierda). B) Citotoxicidad en células mMSCs de los *Perfecta*-Exos^{B16-F10} (derecha) y *Perfecta*-Exos^{mMSCs} (izquierda).

6.4.2.3. Visualización en cultivos celulares por microscopía confocal

La presencia de los *Perfecta*-Exos^{B16-F10} y *Perfecta*-Exos^{mMSCs} en células en cultivo se evaluó por microscopía confocal empleando los exosomas purificados de células incubadas con la emulsión de lecitina fluorescente (capítulo 4). En la **figura 6.28** los núcleos aparecen marcados en azul y la ruta endosomal aparece en verde.

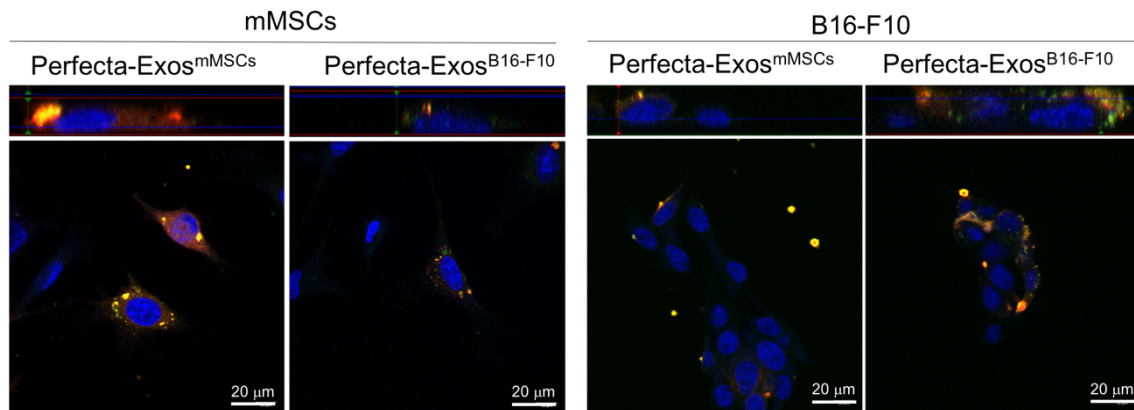


Figura 6.28. Microscopía confocal de células B16-F10 y mMSCs incubadas con *Perfecta*-Exos^{B16-F10} y *Perfecta*-Exos^{mMSCs} (ambos fluorescentes) durante 6 horas.

Las proyecciones ortogonales realizadas a partir de las adquisiciones en dirección Z muestran la distribución de ambos tipos de exosomas en el citoplasma celular tras 6 h de incubación, evidenciando de nuevo el direccionamiento de los exosomas hacia sus células diana (las mMSCs incorporaron preferentemente *Perfecta*-Exos^{mMSCs} mientras que las células B16-F10 capturaron más *Perfecta*-Exos^{B16-F10} comparado con los exosomas derivados de la otra línea celular). Si bien, este direccionamiento celular se evidenció más significativamente en el caso de las mMSCs. En estas imágenes también puede observarse la co-localización entre los *Perfecta*-Exos y la ruta endosomal positiva para CD63 (píxeles amarillos).

6.4.2.4. ¹⁹F-MRI *in vivo*

Para comprobar el potencial de los *Perfecta*-Exos^{mMSCs} como agentes de imagen por ¹⁹F-MRI se inyectaron en un grupo de animales 50 µg de exosomas (en 100 µL de PBS volumen final) y en otro grupo 100 µL de emulsión en la vena de la cola de los ratones. En ambos caso se administró la misma cantidad de átomos de flúor provenientes de la *Perfecta* ($2,51 \times 10^{19}$). A la hora de hacer las adquisiciones, se incluyó también el vial conteniendo la solución de cada uno de los vectores para tenerlo como referencia. La **figura 6.29** incluye las imágenes de ¹H-MRI y ¹⁹F-MRI de los ratones pasadas 48 horas de la administración intravenosa. En las secciones de ¹H puede verse el tumor a la izquierda (señalado con un círculo de color verde). En las adquisiciones de ¹⁹F, en el caso de la emulsión no se observó señal de flúor en el tumor. Por el contrario, cuando los ratones se trataron con los exosomas, se evidenció claramente una señal de ¹⁹F alrededor del tumor, que también pudo observarse en la médula ósea. Postulamos que este hecho está atribuido al origen celular de los exosomas empleados ya que derivan de células mesenquimales procedentes de médula ósea.

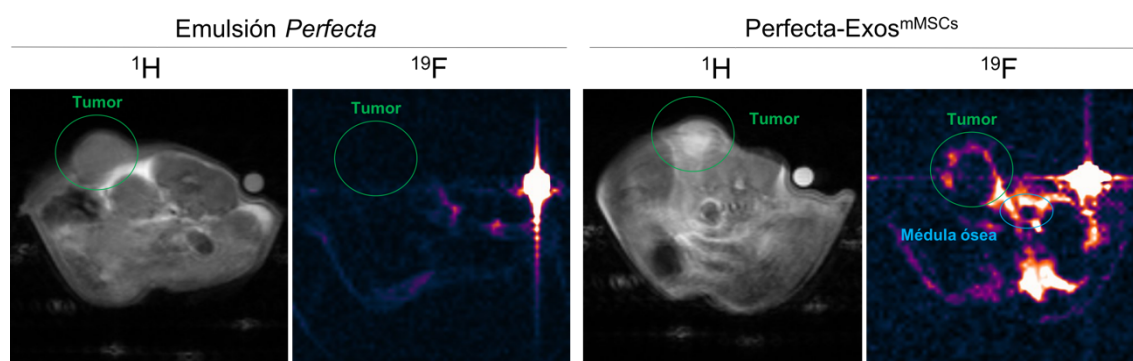


Figura 6.29. Imagen ¹H-MRI y ¹⁹F-MRI de ratones tratados con la emulsión y con los exosomas conteniendo la *Perfecta* pasadas 48 horas de la administración intravenosa.

El análisis de H&E (**figura 6.30**) no reveló cambios relevantes en la morfología histopatológica de ninguno los animales tratados con los vehículos administrados. Si bien, se evidenciaron lesiones inflamatorias leves en algunos órganos, particularmente en los animales sacrificados 1 semana después de la administración, tanto de la emulsión como de los exosomas con *Perfecta*. En el hígado, se observó una pericolangitis leve y degeneración multifocal hepatocelular con ligera vacuolización citoplasmática. Por su parte, el páncreas presentó infiltración linfoplasmocitaria leve en grasa peripancreática. Además, en el bazo de los ratones sometidos al tratamiento de exosomas, se observó una hiperplasia linfoide folicular.

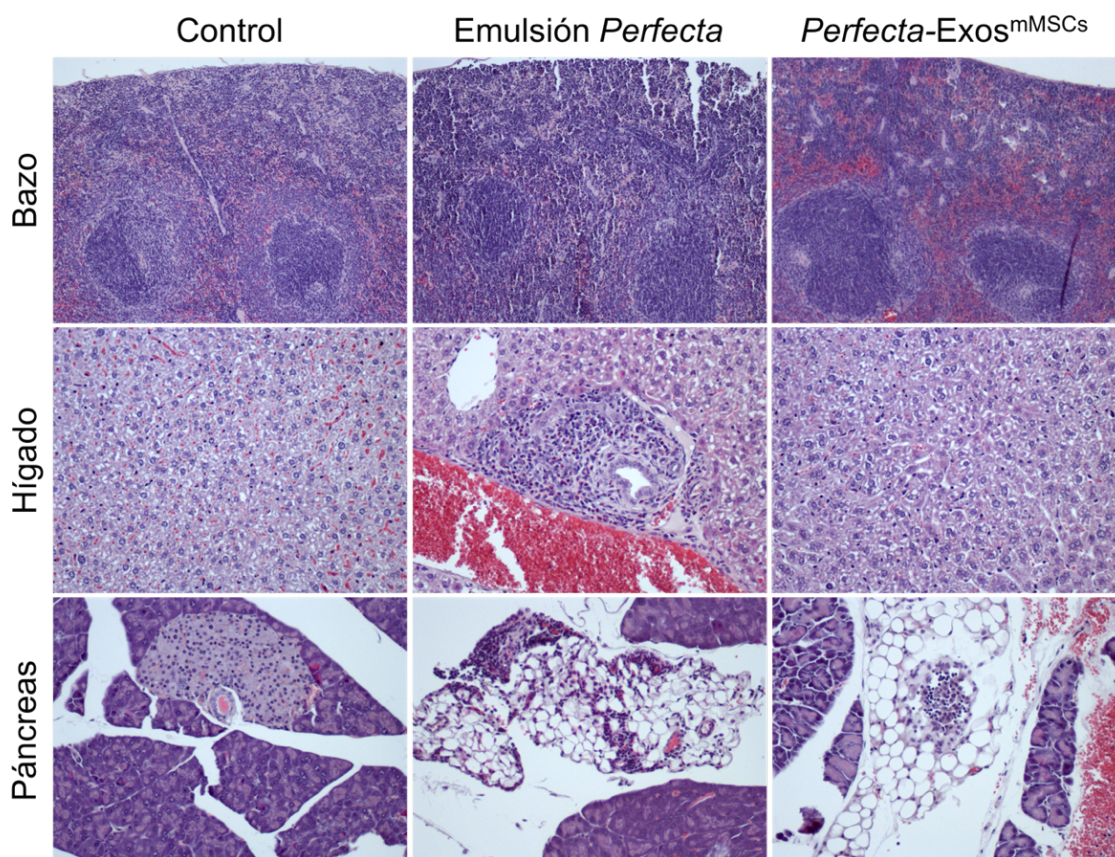


Figura 6.30. Imágenes representativas del análisis histopatológico de cortes de bazo, hígado y páncreas de animales tratados con le emulsión y con los exosomas cargados con *Perfecta* (10 x en bazo y 20 x en hígado y páncreas).

VI.3.3. Conclusiones de esta sección

Los exosomas derivados de mMSCs cargadas previamente con la molécula de *Perfecta* (*Perfecta-Exos^{mMSCs}*) presentan una respuesta suficientemente intensa como para ser visualizados por MRI al acumularse en suficiente cantidad. Además, el direccionamiento aportado por los exosomas permite que sean internalizados selectivamente en células diana. Cuando se emplean como vectores de MRI en un modelo xenograft murino, se comprueba la acumulación de los *Perfecta-Exos^{mMSCs}* en

6. Exosomas y nanopartículas. Agente de imagen y diagnóstico

los tumores, en comparación con la *Perfecta* administrada en un vector no específico en forma de emulsión.

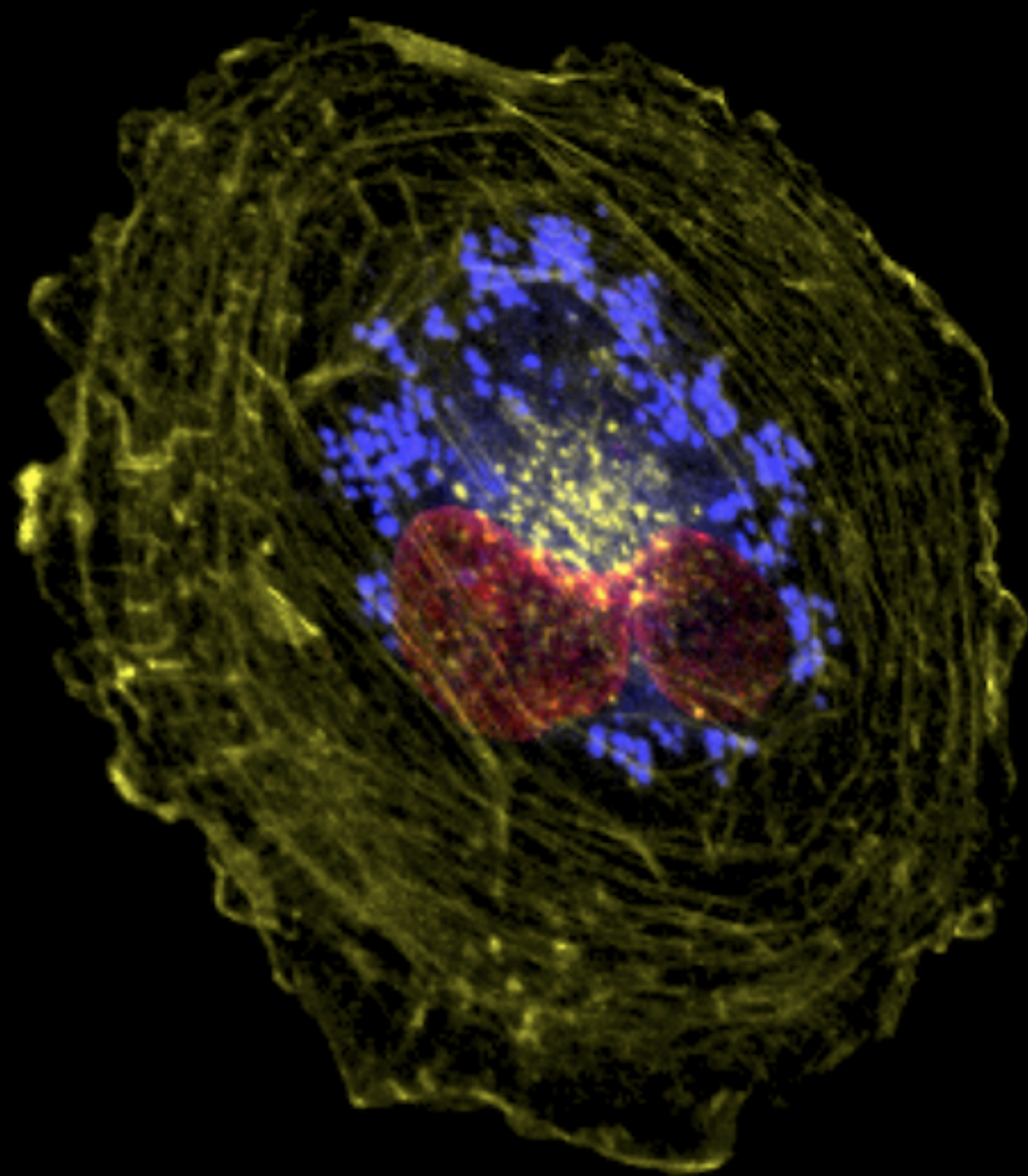


Imagen de microscopía confocal de una célula tumoral de glioblastoma U251-MG.
Marcaje de la actina (amarillo), lisosomas (azul) y núcleos (azul).

7. Combinación de exosomas y nanopartículas como herramienta antitumoral *in vitro*

7. Combinación de exosomas y nanopartículas como herramienta antitumoral *in vitro*

7.1. Introducción

Gran parte del éxito de una determinada terapia para combatir el cáncer (basándose en las NPs) depende de la llegada efectiva del agente antitumoral a la zona neoplásica.³¹³ Hasta ahora se han utilizado diferentes herramientas para dirigir las NPs directamente a los tumores, tanto por mecanismos pasivos como activos. La acumulación de NPs por mecanismos pasivos está basada en el EPR de los vasos sanguíneos de los tumores. Éstos presentan grandes poros y fenestraciones (de 100 a 2000 nm de diámetro) entre las células endoteliales, a través de los cuales las partículas terapéuticas pueden extravasarse, y gracias a la vaga vasculatura y a la presión creada por el pobre drenaje linfático, alcanzar el interior de estos tejidos tumorales.⁴¹³¹⁴ Sin embargo, existen evidencias de que la acumulación de partículas en los tumores por este método pasivo es reducida, del orden del 0,7 %.^{315,316} Por ello, se han desarrollado estrategias de direccionamiento activo. Entre estas estrategias, destacan la funcionalización de las partículas con diferentes tipos de polímeros, como por ejemplo con PEG, o la encapsulación del agente terapéutico en liposomas. Existen fármacos aprobados por la FDA basados en liposomas pegilados cargados con DOX (como Caelyx® o Doxil®) o con PTX (como es el caso del Abraxane®), todos ellos aprobados en terapias contra el cáncer.³¹⁷ La unión de este polímero a la superficie de las partículas o la encapsulación en liposomas minimizan su opsonización, reduciendo la activación del sistema inmune así como su filtración hepática y su eliminación renal. Todo ello aumenta el tiempo de circulación en sangre y por tanto la biodisponibilidad de las partículas en el torrente sanguíneo para alcanzar las regiones tumorales. Sin embargo, la funcionalización con polímeros no evita que las partículas sigan siendo reconocidas como entidades extrañas, y por tanto eliminándolas del torrente circulatorio, todo haciendo que su llegada al tumor siga siendo insuficiente.¹⁷²

Es necesario diseñar nuevas estrategias para dirigir selectiva y específicamente las NPs terapéuticas a las zonas tumorales, maximizando e incrementando su acumulación en los tejidos cancerosos. Un estudio realizado este mismo año por Sindwani *et al.*, mantiene que más del 97 % de las NPs que alcanzan los tumores siguen mecanismos activos transendoteliales y que además, la cantidad de NPs acumuladas dentro de las células tumorales depende del material, del tamaño, de la morfología así como de los grupos funcionales expuestos en su superficie.³¹⁵ Entre los mecanismos de

acumulación activa, se encuentran todos aquellos que implican la funcionalización de la superficie de las NPs con entidades que reconocen específicamente sitios activos del tumor (por ejemplo, proteínas o moléculas presentes en los vasos sanguíneos peritumorales e intratumorales, en la ECM, en las propias células tumorales o incluso en sitios diana específicos dentro de las células cancerosas). Como se ha descrito en la introducción, el direccionamiento activo, permite aumentar la internalización de las NPs en las células tumorales diana, gracias a un aumento en la endocitosis mediada por receptores a través del anclaje de anticuerpos y otras biomoléculas (péptidos, polisacáridos, aptámeros, polisacáridos, mRNA, etc.).

A pesar de todos los avances logrados en los últimos años, estos mecanismos no son aún suficientemente eficaces como para dirigir las partículas selectivamente a los tumores y las eficacias de entrega tumoral siguen siendo menores del 1 % de la carga total de las NPs, incluso cuando estas son funcionalizadas con anticuerpos.³¹⁸ En el ámbito clínico, el empleo de estas biomoléculas para dirigir NPs se utiliza únicamente en ciertos tipos de cáncer que expresan proteínas específicas en sus membranas. Por ejemplo, se han creado partículas combinadas de PLGA y polietilenimina (PEI) que albergan en su interior docetaxel y que están recubiertas con trastuzumab, el cual reconoce específicamente HER2, expresado en células cancerosas de mama. Además, la modificación de la superficie de las NPs tiene un coste elevado y necesita una tecnología y equipamiento sofisticados.³¹⁹ Por ello, el desarrollo de vehículos o vectores que permitan a las partículas terapéuticas alcanzar y tratar selectivamente las células cancerosas hoy en día todavía supone un reto.

Aunque existen diferentes sistemas de liberación de fármacos (incluidos vectores virales, niosomas, dendrímeros, micelas o partículas inorgánicas), los más ampliamente utilizados han sido los liposomas y las NPs poliméricas (**figura 7.1**). Los primeros son vectores sintéticos compuestos por una membrana fosfolipídica que se autoensambla con diferentes tamaños y formas en un entorno acuoso donde encapsular fármacos de naturaleza muy diversa.^{320,321} Las NPs poliméricas sirven como vectores para transportar fármacos y terapias tanto en su interior como ancladas en su superficie.³²² Entre ellas destacan las partículas de PLGA, las cuales se han sintetizado con multitud de tamaños y funcionalizaciones diferentes para convertirlas en vectores selectivos.

7. Exosomas y nanopartículas: Agente terapéutico

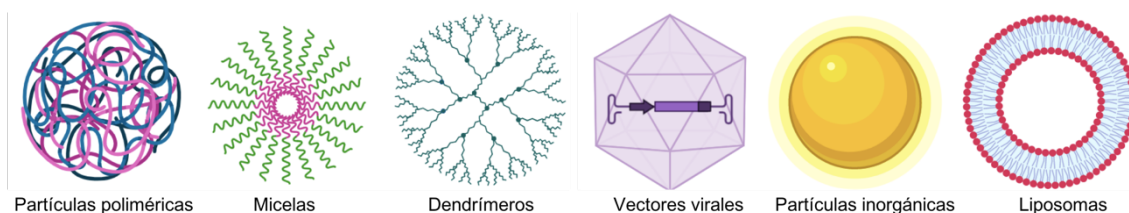


Figura 7.1. Vehículos de liberación de fármacos más ampliamente utilizados para el transporte de terapias antitumorales.

Ante la escasa eficacia de entrega mostrada por las entidades descritas anteriormente, en los últimos años están emergiendo las vesículas extracelulares y en particular los exosomas para proporcionar una nueva herramienta para vehiculizar terapias avanzadas. Entre las características que los convierten en candidatos ideales se encuentran su baja inmunogenicidad (ya que son producidos por el propio organismo), su estabilidad en los fluidos corporales, su alta biodisponibilidad, su elevado tiempo de circulación en sangre y su pequeño tamaño. Pero la característica crucial que hace de los exosomas excelentes agentes de para vehiculizar NPs es su capacidad intrínseca de ser captados específicamente por ciertas células diana, permitiendo la llegada de las diferentes terapias a órganos y células específicos.¹⁴⁸ Estas vesículas se postulan como vehículos novedosos formados por una doble membrana lipídica con características y naturaleza similares a las de la membrana celular, y por una matriz hidrófila interna con una composición semejante a la del citoplasma de la célula parental secretora.

Gran parte de las estrategias terapéuticas emplean exosomas para vehiculizar ácidos nucleicos, pequeñas moléculas quimioterapéuticas o agentes terapéuticos biológicos, tales como proteínas, ácidos nucleicos o virus.^{135,323,170,136,324} Únicamente unos pocos trabajos han descrito la combinación de exosomas con NPs de diferentes materiales para el tratamiento de cáncer.^{116,122,325,143,127,140,141,125} Principalmente, en estos trabajos se han utilizado o bien MNPs como SPIONs (para desarrollar terapias antitumorales mediadas por hipertermia magnética) o AuNPs. Por ejemplo, Jia *et al.*, co-encapsularon SPIONs y cúrcuma en exosomas derivados de células de glioma y además anclaron a su superficie el péptido dirigido al neuropilo-1, dotando a estos exosomas de propiedades teragnósticas.¹²²

Como ya se ha discutido en capítulos anteriores, una de las principales dificultades en el empleo de los exosomas como vehículos de NPs terapéuticas es el desarrollo de metodologías para encapsular dichas NPs sin alterar sus propiedades. En concreto, considerando la naturaleza metálica y el gran tamaño intrínseco de las NPs comparado con la encapsulación de moléculas terapéuticas, en los capítulos anteriores

se han desarrollado, estrategias para internalizar NPs metálicas terapéuticas en exosomas de diferentes líneas celulares sin alterar su funcionalidad. Una vez solventado este reto, en este capítulo se estudia el potencial terapéutico *in vitro* de los vehículos híbridos basados en exosomas y NPs descritos en los capítulos anteriores en tres escenarios diferentes: 1) exosomas derivados de células U251MG y hpMSCs cargados con PtNPs como agente quimioterapéutico; 2) exosomas derivados de células A549 con PdNSs en su interior como agentes catalíticos bioortogonales, y por último; 3) exosomas derivados tanto de células B16-F10 como de hpMSCs cargados con PEG-HGNs como vehículos de hipertermia óptica. En todos los casos el objetivo ha sido combinar la capacidad de direccionamiento aportadas por los exosomas con las funcionalidades propias de las NPs encapsuladas.

7.2. Pt-Exos derivados de células U251 y hpMSCs

Durante muchos años, las moléculas organometálicas basadas en platino han recibido gran atención debido a sus propiedades electrónicas y catalíticas.^{326,327} En el campo de la medicina, los compuestos de Pt han sido también utilizados debido a sus propiedades terapéuticas.³²⁸ Fue ya en 1965 cuando Rosenberg descubrió por accidente el primer fármaco con Pt (conocido como cisplatino o *cis*-diamminadichloroplatino II) cuando estudiaba los efectos de la corriente eléctrica en el crecimiento bacteriano.³²⁹ El cisplatino, ha demostrado desde los años 70 un gran éxito terapéutico en el tratamiento de tumores sólidos y de células germinales y hoy en día, sigue siendo utilizado como quimioterapia de primera línea para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.^{330,331} El principal mecanismo de acción de los complejos derivados del Pt, radica en establecer uniones covalentes con las bases nitrogenadas del ADN. Los enlaces cruzados formados entre las cadenas de ADN o entre el ADN y las proteínas, generan estructuras secundarias capaces de bloquear la transcripción y replicación de las células tumorales, conduciendo a su apoptosis o necrosis.³³² Sin embargo, la aparición y desarrollo de resistencias al tratamiento así como su elevada toxicidad sistémica en tejidos sanos, impiden la aplicación de la dosis necesaria para maximizar su efecto antineoplásico, reduciendo finalmente su eficacia terapéutica.³³³ En los últimos años se ha impulsado la búsqueda de otros fármacos derivados del Pt que presenten mayor eficacia antitumoral y menor toxicidad sistémica, un intento que ha dado lugar a multitud de análogos estructurales y al desarrollo de una segunda generación de fármacos derivados del cisplatino (carboplatino, oxaliplatino o nedaplatino) que ya han sido explotados en la clínica como agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de cáncer.^{334,335,336} A pesar de las mejoras obtenidas, estos complejos siguen sin ser selectivos únicamente a células tumorales y por tanto las

7. Exosomas y nanopartículas: Agente terapéutico

células sanas del organismo también se ven afectadas, conduciendo a grandes toxicidades y efectos secundarios sistémicos (en particular afecciones gastrointestinales, renales y neuropáticas) que en conjunto, continúan limitando su aplicación en el paciente.

Con el objetivo de minimizar estos efectos indeseados, recientemente se ha descrito la encapsulación y la vehiculización directa a zonas diana del organismo de estas moléculas en diferentes vectores nanotecnológicos tales como liposomas o moléculas poliméricas o copoliméricas. Las formulaciones liposomadas del cisplatino y del oxaliplatino (LipoplatinTM y LipoxalTM) han permitido reducir la toxicidad de los compuestos activos desnudos y a la vez incrementar la acumulación en las zonas tumorales.^{337,338} Gran parte de los esfuerzos se centran también en la búsqueda de compuestos alternativos que presenten toxicidades significativamente más bajas y que al mismo tiempo mejoren su actividad antitumoral. Entre esta nueva generación de compuestos antitumorales, se encuentran las nanopartículas de Pt (PtNPs),³³⁹ que han despertado un gran interés en la comunidad científica por su facilidad para modular sus propiedades catalíticas, ópticas y químicas simplemente cambiando su tamaño y forma. Respecto a su mecanismo de acción como agente anticancerígeno, se han descrito roturas del ADN de doble cadena mediadas por estos iones Pt derivados de las partículas (similar al efecto causado por el cisplatino).³⁴⁰ Se ha visto que cuando las PtNPs se conjugan al ADN, interaccionan con la doble hélice de forma directa induciendo roturas en sus cadenas (efecto directo). Pero, además, se ha observado un daño al ADN mediado por las moléculas de agua que rodean las partículas, las cuales son capaces de generar agrupaciones de radicales que pueden también dañar la hélice (efecto indirecto). Algunos trabajos han demostrado que las PtNPs inducen muerte celular mediada por apoptosis inhibiendo la división de las células.³⁴¹ Este es el caso de Bendale *et al.*, quienes demostraron el efecto citotóxico dosis dependiente de las PtNPs, logrando inhibir hasta un 66 % el crecimiento del tumor en ratones SCID tras 13 días de la administración.³⁴² Porcel *et al.*, publicaron que la combinación de PtNPs con irradiación (radioterapia), aumentaba la eficacia de la terapia antitumoral debido a un incremento letal en el daño al ADN.³⁴³ En otros estudios se ha visto que PtNPs de 30 a 60 nm de diámetro funcionalizadas polifenol del te (TPP), provocan la muerte de células de cáncer de cérvix produciendo una parada de la fase G2/M de su ciclo celular.³⁴⁴ Por su parte, Gehnrke *et al.*, observaron que las PtNPs tenían efecto citotóxico *in vitro* en células humanas de cáncer de colon HT29 y Caco-2 debido a un daño en el ADN y a una alteración del sistema redox celular.³⁴⁵

7. Exosomas y nanopartículas: Agente terapéutico

A pesar de las prometedoras propiedades de las PtNPs como agentes antitumorales, sigue siendo necesario el desarrollo de vectores que nos permitan vehiculizar la terapia de manera selectiva a las células y tejidos diana para evitar los efectos secundarios y, al mismo tiempo, maximizar su eficacia terapéutica. En esta Tesis Doctoral nos hemos servido del nuevo método de síntesis de partículas *in situ* directamente en el interior de exosomas por reducción con el gas CO a partir de un precursor metálico (capítulo 5). En esta sección se estudiarán sus propiedades antitumorales, fundamentadas en la combinación de las características únicas de las PtNPs como agente anticanceroso con las propiedades de direccionamiento celular de los exosomas como vectores de señalización intercelular selectivos.

7.2.1. Experimental

7.2.1.1. Aislamiento y caracterización de exosomas y preparación de los Pt-Exos

Los exosomas derivados de células hpMSCs y U251-MG (Exos^{hpMSCs} y Exos^{U251-MG}) se aislaron por ultracentrifugación (protocolo detallado en el capítulo 3). La encapsulación de las PtNPs en su interior se llevó a cabo por el método de generación *in situ* a partir de la incubación con un precursor de Pt y la exposición a una atmósfera de CO (ver capítulo 5). Por último, la caracterización tanto de los Exos^{hpMSCs} y Exos^{U251-MG} (control) como cargados con las PtNPs (Pt-Exos^{hpMSCs} y Pt-Exos^{U251-MG}) se realizó siguiendo las técnicas fisicoquímicas y biológicas ampliamente detalladas en los capítulos 3 y 5.

7.2.1.2. Citotoxicidad metabólica por Alamar Blue y microscopía convencional

El potencial terapéutico de los Pt-Exos^{hpMSCs} como agentes antiproliferativos y citotóxicos, se evaluó en primer lugar por ensayo Alamar Blue (descrito detalladamente en el capítulo 3). A continuación, únicamente se describen la metodología específica de esta sección. En primer lugar, se evaluó la citotoxicidad producida por 4; 2; 1; 0,5; 0,25 y 0,125 μg de Pt-Exos^{hpMSCs}/100 μL incubados durante 48 horas con las células de tres maneras diferentes:

- Pt-Exos^{hpMSCs} (0,156 μg de Pt/ μg proteína de exosoma).
- Pt-Exos^{hpMSCs} (0,156 μg de Pt/ μg proteína de exosoma) cargados simultáneamente con NH_4Cl .
- Pt-Exos^{hpMSCs} (0,156 μg de Pt/ μg proteína de exosoma) con NH_3 en su interior.

En otro experimento, 4; 2; 1; 0,5; 0,25 y 0,125 μg de exosomas/100 μL cargados con cinco y diez veces más de precursor de las PtNPs (0,560 y 0,86 μg Pt/ μg proteína

7. Exosomas y nanopartículas: Agente terapéutico

de exosoma, respectivamente) se pusieron en contacto con las células durante 48 h. De ahora en adelante estos exosomas son denominados como exosomas 5x-Pt-Exos^{hpMSCs} y 10x-Pt-Exos^{hpMSCs}, respectivamente. Los resultados se expresan en porcentaje de viabilidad, tomando como el 100 %, la viabilidad de células sin tratar. Los cultivos incubados con las dosis más altas de exosomas se observaron por microscopía convencional para evaluar la morfología de dichas células.

7.2.1.3. Microscopía de fluorescencia y ensayo LIVE/DEAD

Para evaluar la capacidad citotóxica de los Pt-Exos^{hpMSCs} *in vitro*, se sembraron hpMSCs en placas de 96 pocillos. Tras mantener las células durante 24 horas en cultivo, se añadieron 4 y 2 µg de exosomas/100 µL tanto de 5x-Pt-Exos^{hpMSCs} como de 10x-Pt-Exos^{hpMSCs} (0,560 y 0,86 µg Pt/µg proteína de exosoma, respectivamente). Pasadas 48 horas, se retiró el medio de cultivo con los exosomas y se lavaron las células dos veces con PBS. La citotoxicidad provocada por ambos tipos de exosomas cargados con las PtNPs se evaluó mediante el ensayo LIVE/DEAD (Thermo Fisher) por microscopía de fluorescencia.

7.2.1.4. Citometría de flujo y muerte selectiva: ciclo celular y necrosis/apoptosis

Los cambios en el ciclo celular producidos por los 5x-Pt-Exos^{hpMSCs} y los 10x-Pt-Exos^{U251-MG} se analizaron por citometría de flujo. Para ello, células hpMSCs y U251-MG se incubaron con los exosomas derivados de ambas líneas celulares (2 µg de exosomas/100 µL) durante 48 horas. El porcentaje de células en cada fase de ciclo celular se evaluó por citometría de flujo siguiendo las instrucciones descritas anteriormente. Para estudiar las diferentes vías de muerte celular (necrosis y/o apoptosis) empleadas por las células expuestas a los Pt-Exos, células U251-MG y hpMSCs se sembraron en placas de 6 pocillos y se incubaron con 2 µg de exosomas/100 µL (tanto de 10x-Pt-Exos^{hpMSCs} como de 10x-Pt-Exos^{U251-MG}) en 1,5 mL de medio de cultivo.

Pasadas 48 horas, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en 200 µL de PBS con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para el marcaje con 5 µL de anexina V-FITC y 5 µL de solución de IP, durante 15 minutos. La anexina V se une a fosfatidilserina (expuesta en el exterior de la membrana celular únicamente en apoptosis temprana). El IP es un agente intercalante que atraviesa la membrana plasmática y se une al ADN únicamente cuando la integridad de la misma se ha perdido y la célula se encuentra en necrosis. Éstas se analizaron por citometría de flujo en un citómetro FACSaria (Becton Dickinson).

7.2.2. Resultados y discusión

7.2.2.1. Caracterización de exosomas y preparación de los Pt-Exos

Los resultados referentes a la caracterización de los exosomas derivados de células U251-MG y hpMSCs, así como la carga de Pt por reducción de un precursor iónico en presencia de CO se han descrito en el capítulo 5. Por ello, a continuación, se recogen únicamente los resultados referentes al estudio del potencial terapéutico de los Pt-Exos en cultivos celulares.

7.2.2.2. Citotoxicidad metabólica y microscopía convencional

La **figura 7.2** muestra la actividad citotóxica *in vitro* de los Pt-Exos^{hpMSCs}. Sus células parentales (hpMSCs) se incubaron con diferentes concentraciones de Pt-Exos^{hpMSCs} durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo Alamar Blue y el % de viabilidad fue obtenido considerando que las células control (sin tratamiento) se correspondían con un 100 % de viabilidad. En azul, puede observarse la viabilidad celular de las células tratadas con Pt-Exos^{hpMSCs}. En este caso, no se produjo una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad celular a ninguna de las dosis estudiadas (comparado con las células control).

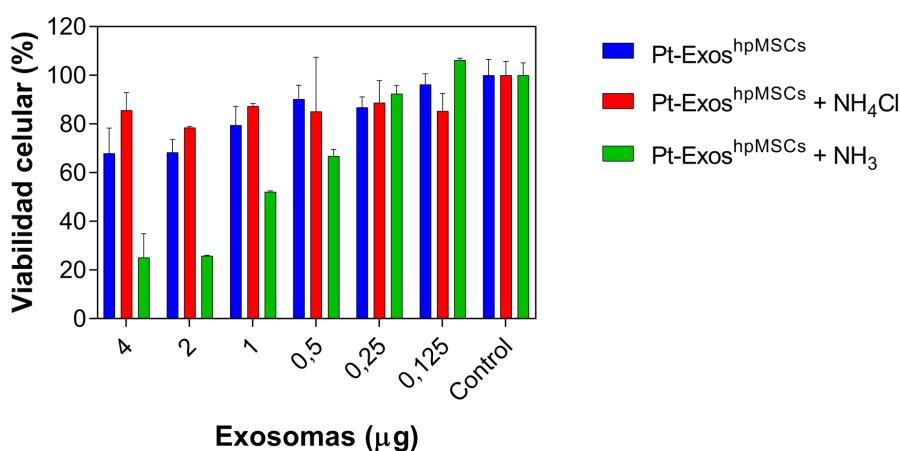


Figura 7.2. Actividad citotóxica de los exosomas derivados de células hpMSCs sobre sus propias células parentales cuando éstos eran cargados 1) PtNPs; 2) con PtNPs y una sal de NH₄Cl o 3) con PtNPs en presencia de amoníaco.

En vista de estos resultados y considerando la estructura de la molécula de cisplatino (formada un átomo central de Pt coordinado a dos átomos de cloruro y a dos ligandos amonio) se realizó un nuevo abordaje aplicando una atmósfera reductora con CO a exosomas que habían sido co-preincubados previamente no sólo con el precursor de Pt, sino además con 1) una sal de NH₄Cl o 2) con amoníaco (NH₃). En el caso de los exosomas co-incubados con el precursor de Pt y con NH₄Cl, la **figura 7.2** demuestra de nuevo como no se obtuvo una disminución estadísticamente significativa del porcentaje

de células vivas (rojo). Por el contrario, cuando las células fueron incubadas con el precursor de Pt, pero en presencia de amoníaco, se produjo una marcada disminución dependiente de la dosis (verde). Sin embargo, este efecto citotóxico no fue atribuido a un mecanismo selectivo mediado por los exosomas cargados con amoníaco y PtNPs, sino a un cambio de pH instantáneo en el cultivo celular al añadir el tratamiento (observado gracias al indicador de pH rojo fenol presente en el medio de cultivo). Por lo tanto, estas diferencias no pueden atribuirse al potencial citotóxico de nuestro vector.

Considerando la baja eficacia terapéutica obtenida por el procedimiento anterior, se decidió explorar un abordaje alternativo utilizando exosomas incubados con más cantidad de precursor de Pt con el propósito de aumentar la cantidad de PtNPs formadas en su interior. Para ello, exosomas cargados con cinco y diez veces más de precursor y posteriormente reducidos siguiendo el protocolo de incubación con CO (5x-Pt-Exos y 10x-Pt-Exos), se pusieron en contacto con las células y se evaluó de nuevo su potencial efecto citotóxico (**figura 7.3**). Cuando las células parentales fueron tratadas con los 5x-Pt-Exos^{hpMSCs} y 10x-Pt-Exos^{hpMSCs}, se produjo una disminución de la viabilidad celular estadísticamente significativa. Esta disminución era dependiente de la dosis y como cabe esperar, este efecto citotóxico se observó con mayor intensidad en el caso de los 10x-Pt-Exos^{hpMSCs}. En concreto, se obtuvieron viabilidades menores del 10 %, 30 % y 60 % al incubarse 4, 2 y 1 μg de 10x-Pt-Exos^{hpMSCs} con sus células parentales. En el caso de los 5x-Pt-Exos^{hpMSCs}, los valores de viabilidad celular obtenidos cuando se incubaron 4 y 2 μg de estos exosomas eran de un 17 % y un 57 %, respectivamente. Los exosomas sin PtNPs en su interior (Exos^{hpMSCs}), se utilizaron como control, obteniéndose viabilidades en torno al 100 % en todos los casos.

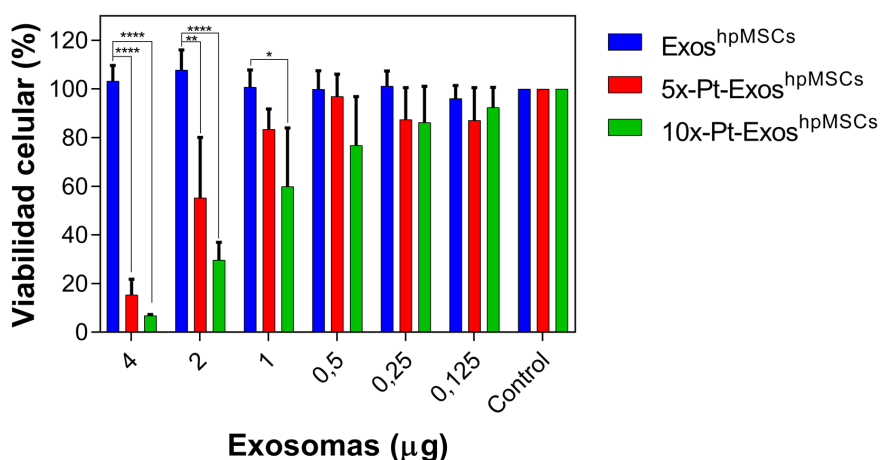


Figura 7.3. Actividad citotóxica de los exosomas derivados de células hpMSCs sobre sus propias células parentales cuando éstos eran incubados con cinco y con diez veces más de precursor de platino y posteriormente reducidos en una atmósfera de CO (5x-Pt-Exos^{hpMSCs} y 10x-Pt-Exos^{hpMSCs}).

7. Exosomas y nanopartículas: Agente terapéutico

Esta disminución en la viabilidad celular fue acompañada de una modificación en la morfología celular. La **figura 7.4** recoge imágenes en campo claro de hpMSCs incubadas con 4 y 2 μg de 5x-Pt-Exos^{hpMSCs} y 10x-Pt-Exos^{hpMSCs}, observándose como las células adoptaron una morfología redondeada, estrellada y con gran cantidad de vesículas y cuerpos apoptóticos en su interior, mucho más evidente cuando las células era incubadas con 4 μg de ambos tipos de exosomas (dosis máxima probada). Los niveles de toxicidad provocados por los 5x-Pt-Exos^{hpMSCs} y 10x-Pt-Exos^{hpMSCs} están en concordancia con los datos del MP-AES mostrados en la **tabla 5.2** (0,560 y 0,860 μg de Pt/ μg proteína exosomas, respectivamente). Esto es, conforme se incrementaba la cantidad de Pt en los exosomas, su potencial citotóxico aumentaba.

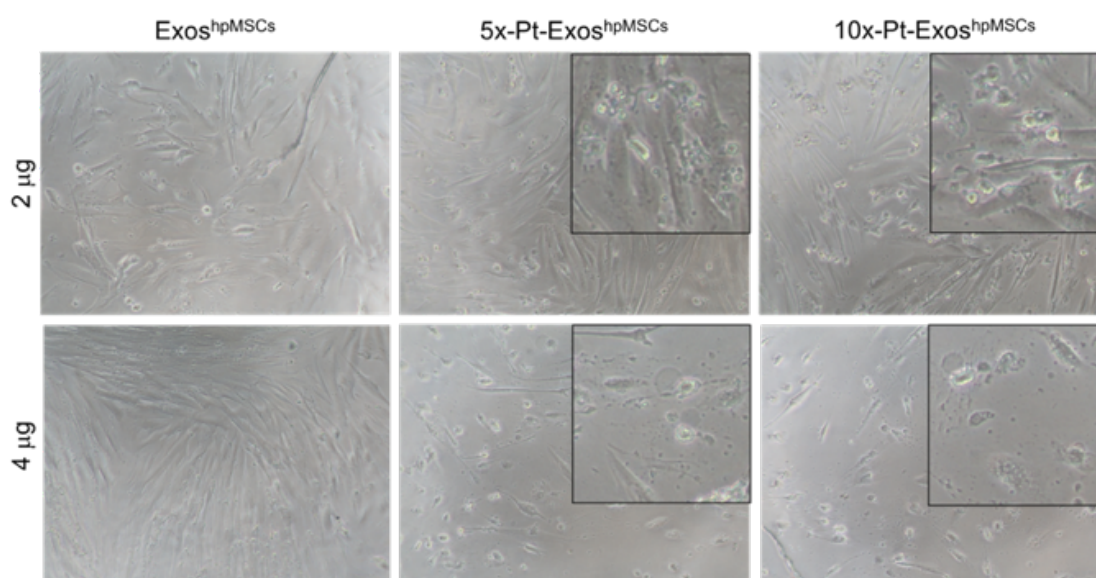


Figura 7.4. Fotografías de cultivos celulares de hpMSCs incubadas durante 48 horas con 4 y 2 μg de exosomas control, exosomas cargados con cinco y con diez veces más de precursor de platino y posteriormente reducidos en una atmósfera de CO.

7.2.2.3. Microscopía de fluorescencia y ensayo LIVE/DEAD

La influencia de los Pt-Exos^{hpMSCs} en cultivos celulares de sus células parentales, se evaluó también mediante el kit LIVE/DEAD. Tras la incubación de las células durante 48 horas con 4, 2 y 0,5 μg de exosomas cargados (dosis elegidas a partir del experimento anterior), se procedió a la realización del marcaje y a su visualización con un microscopio invertido de fluorescencia (**figura 7.5**).

Al incubar las células con Exos^{hpMSCs}, mostraron una alta viabilidad, observándose la mayor parte de las células del pocillo verdes (teñidas por la calceína del kit), indicativo de la estabilidad de las membranas celulares. La presencia de células teñidas por el EthD-1 y por tanto muertas, es despreciable en los pocillos tratados con todas las cantidades de Exos^{hpMSCs} estudiadas. Las células incubadas con los 5x-Pt-

7. Exosomas y nanopartículas: Agente terapéutico

Exos^{hpMSCs} y 10x-Pt-Exos^{hpMSCs} mostraron una cantidad significativamente más baja de células marcadas en verde (células vivas) siendo rojas la gran mayoría de ellas. Esto se observó claramente cuando las células eran incubadas con 4 μg y, en menor medida, con 2 μg de estas vesículas. Las células de los pocillos incubadas 0,5 μg de Pt-Exos^{hpMSCs}, mantuvieron unos niveles de viabilidad similares a los controles, observándose verdes en las fotografías tomadas en el microscopio de fluorescencia. Estos resultados están en concordancia con el análisis cuantitativo de la actividad citotóxica descrito anteriormente (**figura 7.3**).

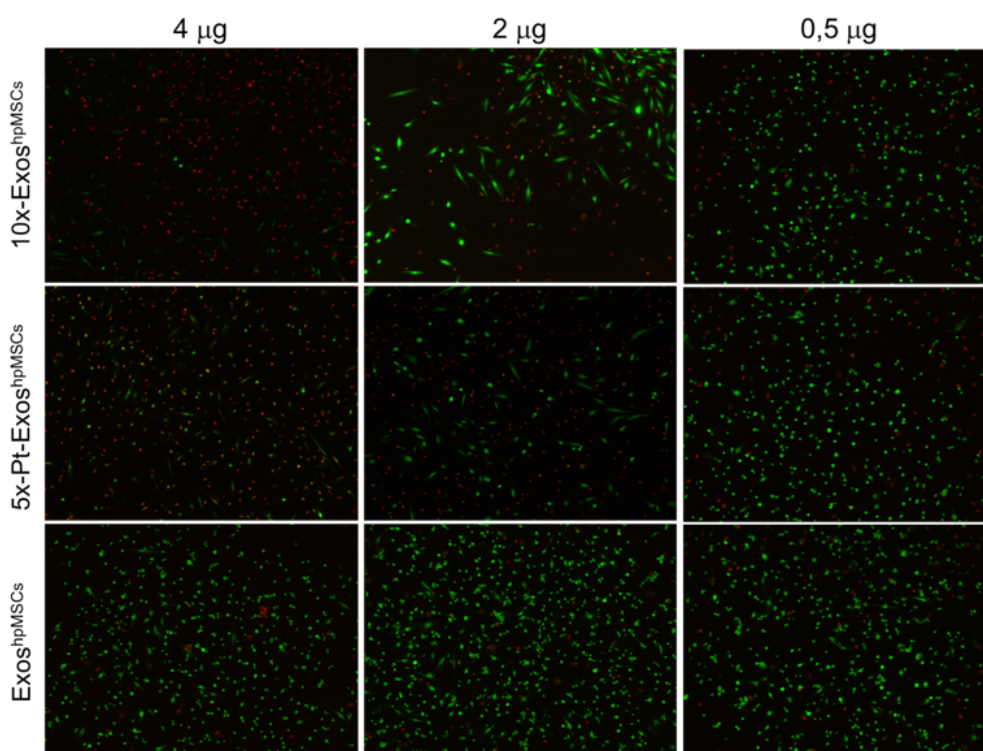


Figura 7.5. Influencia de la concentración de exosomas cargados con PtNPs en la viabilidad celular de células hpMSCs por el ensayo LIVE/DEAD.

7.2.2.4. Citometría de flujo: evaluación del ciclo celular y de la necrosis/apoptosis

Una vez establecido el efecto de los Pt-Exos sobre la viabilidad celular, se decidió evaluar si dicho efecto antiproliferativo era específico y selectivo estudiando la influencia de dichos complejos en la proliferación celular. Se realizó un análisis del ciclo celular de varias líneas celulares tanto en presencia como en ausencia de dichos exosomas cargados con diferentes cantidades de PtNPs y derivados de diversas líneas celulares (**figura 7.6**). Se estudió la influencia de 10x-Pt-Exos^{hpMSCs} y 10x-Pt-Exos^{U251-MG} sobre cultivos celulares de ambas líneas celulares parentales (hpMSCs y U251-MG).

Los resultados muestran una disminución estadísticamente significativa en el porcentaje de células en la fase G1 cuando dichas células eran incubadas únicamente

7. Exosomas y nanopartículas: Agente terapéutico

con Pt-Exos derivados de su misma línea celular, comparado con células control (sin tratar). Por lo contrario, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas del porcentaje de células en ninguna de las fases (G1, G2/M y S) cuando las células se incubaban con 10x-Pt-Exos derivados de otra línea celular (U251-MG). Cuando las hpMSCs se incubaron con 10x-Pt-Exos^{hpMSCs}, se produjo una disminución del porcentaje de células en fase G1, alcanzando un valor del 55 %, comparado con el control (los cultivos de células sin tratar presentaron un 76,96 % de las células en la fase G1 y los cultivos de células hpMSCs tratados con 10x-Pt-Exos^{U251-MG} exhibieron un 66,33 % de células en fase G1). Cuando las células U251-MG se pusieron en contacto con los Pt-Exos^{U251-MG}, el porcentaje de células en fase G1 disminuyó hasta un 40,78 %. Por su parte, en las células U87-MG sin tratar, y en los cultivos de células U251-MG tratados con 10x-Pt-Exos^{hpMSCs} los porcentajes de células en fase G1 fueron muy similares, de un 66,88 % y un 63, 66%, respectivamente. Esta disminución de células en fase G1 cuando ambas líneas celulares eran incubadas con sus propios exosomas cargados con las PtNPs, condujo a la inhibición del crecimiento celular y subsecuentemente, a la muerte celular. De manera contraria, cuando las células fueron incubadas con los Pt-Exos derivados de la otra línea celular, no se obtuvieron diferencias significativas en los % de células en cada una de las fases del ciclo celular, comparado con el control. Estos resultados se atribuyen a que éstos no son internalizados por células de distinto linaje parental y, en consecuencia, no liberan su contenido de PtNPs al interior celular. Aquí se demuestra por un lado como los exosomas confieren a las PtNPs encapsuladas en su interior propiedades de direccionamiento celular, causando una muerte selectiva en las células de las que derivan. Por otro lado, también se evidenciaron las propiedades de las PtNPs como agentes terapéuticos citotóxicos.

Algunos trabajos muestran como algunos agentes antitumorales conducen a la muerte celular pasando por un aumento de la fase sub-G1 y una disminución de la fase G1. Este es el caso de Murad *et al.*, quienes indicaron que el tratamiento de células de cáncer de mama (MDA-MB-231) con extracto de polisacárido sulfatado de algas (ASPE) producía una disminución de células en fase G1 y un aumento de la muerte de dichas células por apoptosis. Esta parada celular estaba también relacionado con el aumento en la expresión de Bax y en una inhibición de Bcl-2, todo ello resultado en la activación y desbloqueo de la ruta de la Caspasa-3, en la inducción de ROS y finalmente en la muerte celular.³⁴⁶ Los resultados de ciclo celular obtenidos por Bendale *et al.*, también demostraron como células de cáncer de ovario, pulmonar o de páncreas morían después de ser tratadas con PtNPs de manera dosis-dependiente debido a una inhibición de su crecimiento con una disminución de células en fase G1.³⁴²

7. Exosomas y nanopartículas: Agente terapéutico

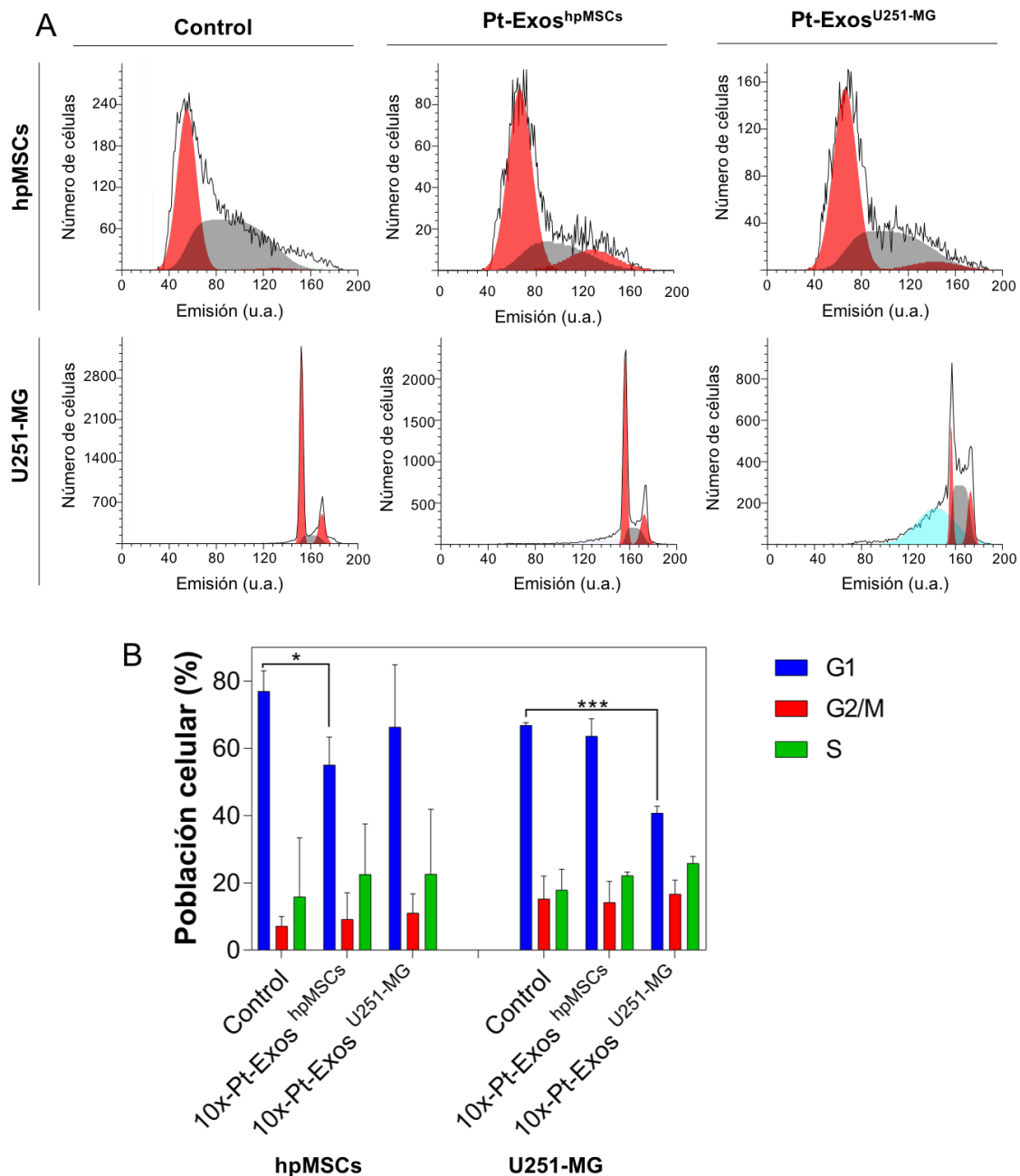


Figura 7.6. A) Gráficos del número de células en cada una de las fases del ciclo celular obtenidos por citometría de flujo. B) Cuantificación del porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular cuando cultivos de hpMSCs y U251-MG eran tratados con Pt-Exos^{hpMSCs} y Pt-Exos^{U251-MG}.

Finalmente, se exploró la ruta de muerte celular causada en ambos tipos de células (tanto hpMSCs y U251-MG) al ser incubadas con los exosomas derivados de su misma línea celular. La **figura 7.7** recoge los resultados referentes al análisis de necrosis/apoptosis obtenidos por citometría de flujo a través del marcaje con anexina V y IP. En el caso de las células hpMSCs control (sin tratar) se obtuvo un porcentaje de células vivas de un 89,78 %. Por su parte, el 7 % y el 2,54 % de células morían por apoptosis y necrosis, respectivamente. Al poner las células en contacto con sus 10x-Pt-

7. Exosomas y nanopartículas: Agente terapéutico

Exos (10x-Pt-Exos^{hpMSCs}), la población de células vivas disminuyó hasta un 59 % y el porcentaje de células muertas por apoptosis y por necrosis se vio incrementado hasta un 9,76 % (verde) y 30,93 % (azul), respectivamente. En el caso de las U251-MG (panel inferior), cuando estas no eran tratadas (control negativo), se obtuvo un porcentaje de células vivas de 90,45 %, y, por el contrario, dentro de las células muertas, el 1,47 % morían por necrosis mientras que el 4,78 % morían por apoptosis. Sin embargo, cuando las células se incubaban con sus exosomas cargados con las PtNPs (10x-Pt-Exos^{U251-MG}), la viabilidad disminuyó hasta un 47,05 % mientras que los porcentajes de células en fase apoptótica y necrótica aumentaron hasta un 36,60 % (verde) y un 14,08 % (azul).

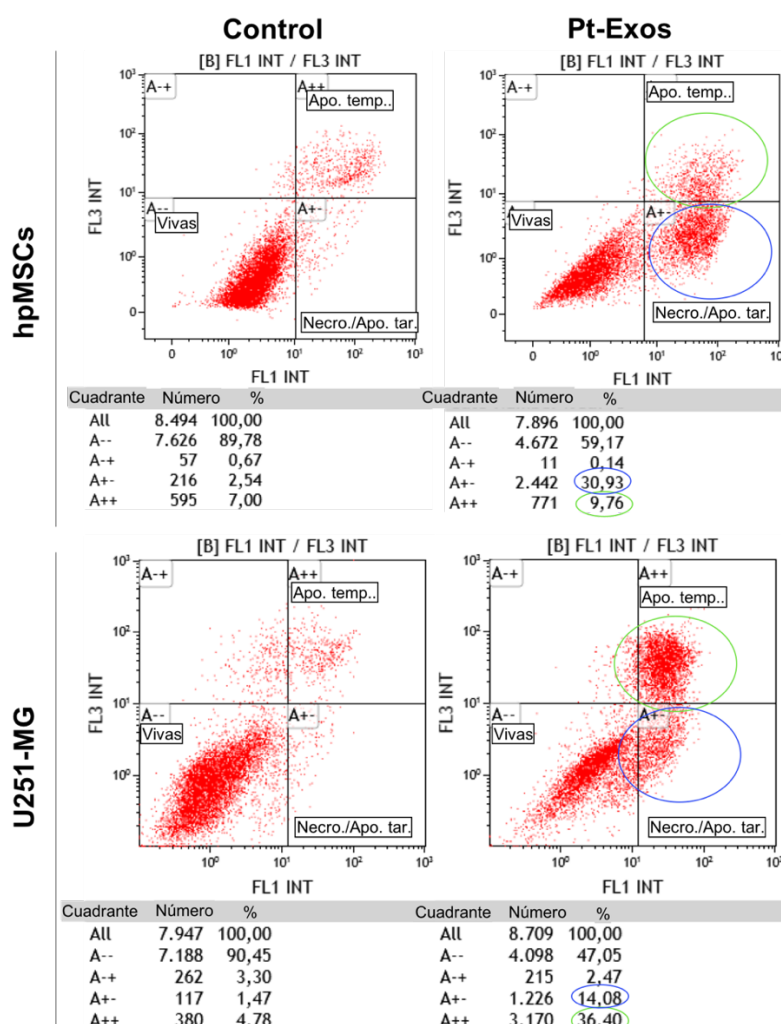


Figura 7.7. Diagramas de citometría de flujo en el estudio de muerte por necrosis y apoptosis de células hpMSCs control e incubadas con 10x-Pt-Exos^{hpMSCs} y de células U251-MG control y tratadas con 10x-Pt-Exos^{U251-MG}.

7.2.3. Conclusiones de esta sección

Los ensayos llevados a cabo en esta sección demuestran que el método de síntesis de las NPs *in situ* descrito en el capítulo anterior nos permite sintetizar

exitosamente PtNPs en el interior de exosomas derivados de varias líneas celulares, sin que disminuya la capacidad de direccionamiento selectivo de los mismos.

Los experimentos de citotoxicidad metabólica y de citometría de flujo (ciclo celular, así como de necrosis/apoptosis), revelan que este nuevo vector es una herramienta atractiva para desarrollar nuevos tratamientos selectivos y específicos con propiedades citotóxicas para el tratamiento del cáncer. Básicamente, combina el potencial citotóxico aportado por las NPs localizadas en el interior de los exosomas, con la capacidad de direccionamiento de estas partículas, permitiendo que el tratamiento sea selectivo y específico hacia células diana.

7.3. **Pd-Exos^{A549} como catalizadores bioortogonales**

La ruta más habitual en la química bioortogonal utiliza la síntesis de moléculas funcionales *in situ* en células diana sin alterar su entorno metabólico ni celular, ya sea para obtener información sobre los procesos bioquímicos que ocurren en su interior o para producir moléculas y fármacos capaces de modular procesos fisiológicos y patológicos.^{347,348} La química bioortogonal proporciona nuevas oportunidades en el campo de la medicina para entender y comprender los procesos biológicos en su propio ambiente nativo.

La catálisis bioortogonal utiliza enzimas o NPs catalíticas que son capaces de facilitar determinadas reacciones de interés dentro de sistemas biológicos vivos. De esta forma, es importante diseñar enzimas o catalizadores inteligentes que se acumulen en las células o los tejidos diana, y que además sean capaces de controlar su actividad catalítica gracias a señales químicas o físicas externas. Hoy en día existen tres principales retos en el desarrollo de estas herramientas catalíticas bioortogonales:

- Es necesario generar un catalizador que sea activo dentro de la célula. Es decir, es necesario proteger este catalizador para que no sea desactivado en el interior celular y que sea funcional en condiciones de temperatura y pH celulares.
- El catalizador debe de estar dirigido únicamente a las células diana para llevar a cabo las reacciones catalíticas específicamente en las células y tejidos objeto de interés, sin alterar ni modificar el metabolismo de otras células.
- Tiene que ser activado inteligentemente como, cuando y donde sea necesario.

7. Exosomas y nanopartículas: Agente terapéutico

Las posibilidades abiertas por la química bioortogonal en los últimos años han inspirado el desarrollo de nuevas estrategias para la síntesis *in vivo* de agentes bioactivos. Debido a la gran variedad y versatilidad de reacciones que son capaces de mediar, los catalizadores basados en metales de transición y en particular los catalizadores de Pd han desempeñado un papel crucial en el desarrollo de herramientas catalíticas novedosas en sistemas biológicos (células, tejidos y animales). En concreto, las PdNSs poseen propiedades físicas y químicas únicas como por ejemplo: efecto SPR que proporciona absorción de luz en el NIR (y por tanto, la posibilidad de hacer terapia por hipertermia óptica), elevada estabilidad en disolución y capacidad de catalizar un gran abanico de reacciones químicas diferentes (por ejemplo, desalquilaciones,^{349,350,351,352,353,354,355,356} reacciones de entrecruzamiento,^{347,356,357,358,359} formación de anillos,³⁶⁰ reacciones de escisión,³⁶¹ etc.) y de generar productos con diferentes grupos funcionales, tanto con aplicaciones terapéuticas como diagnósticas. El uso de la química catalizada por Pd intratumoralmente sería de gran interés para generar especies y/o moléculas citotóxicas *in situ*, es decir, en interior de las células cancerosas a partir de moléculas inocuas o con baja toxicidad. De esta forma, se podría administrar sistémicamente un profármaco inocuo que fuera catalizado al correspondiente fármaco citotóxico únicamente de forma intratumoral,^{168,229,230,362} reduciendo potencialmente los posibles efectos secundarios en órganos sanos.^{350,351,352,353,354}

Aunque se han descrito varias pruebas de concepto con resultados muy prometedores referentes al uso de la catálisis bioortogonal *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*,^{350,354,355,363,364,365} todavía existen importantes limitaciones en cuando al diseño de un catalizador capaz de acumularse y actuar dentro del organismo únicamente en los tejidos y células objeto de estudio. Para solventar este problema, como ya se ha mencionado anteriormente, numerosos estudios se han centrado en la síntesis y el diseño de nuevos sistemas (orgánicos e inorgánicos y con numerosos recubrimientos) de conducción y liberación de fármacos y NPs. No obstante, la eficacia de entrega sigue siendo pobre, se ha reportado que en promedio, menos de un uno por ciento de las NPs administradas alcanzan las células o regiones tumorales, incluso cuando se utilizan NPs recubiertas con anticuerpos altamente específicos.³¹³

A continuación, se describe el empleo de Exos^{A549} y de exosomas derivados de células U87-MG (Exos^{U87-MG}) cargados con PdNSs como catalizadores selectivos capaces de activar específicamente un profármaco en el interior de células diana a través de una reacción de desalquilación. Como prueba de concepto preliminar, se ha diseñado un sensor 1 (no fluorescente) susceptible de ser convertido a un compuesto

altamente fluorescente (compuesto 2). En cuanto al uso terapéutico, se ha sintetizado un profármaco (compuesto 4) del Panobinostat®, recientemente aprobado por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA).

7.3.1. Experimental

7.3.1.1. Aislamiento, caracterización de exosomas y preparación de los Pd-Exos

El aislamiento y la caracterización de los Exos^{A549} y lo Exos^{U87-MG}, así como la carga de Pd por reducción de un precursor iónico en presencia de CO se ha descrito en el capítulo 5. Del mismo modo, también se ha verificado la estabilidad de este nuevo vector híbrido antes de explorar su potencial *in vitro* como catalizador bioortogonal.

7.3.1.2. Síntesis del sensor 1 y la prodroga 4

Los detalles de estos procedimientos, llevados a cabo en el grupo del Prof. Unciti-Broceta de la Universidad de Edimburgo se muestran en el **anexo 4**, donde también se detallan los correspondientes estudios cinéticos.

7.3.1.3. Evaluación de la biocompatibilidad de los Pd-Exos

Una vez determinada la capacidad catalítica en solución de los Pd-Exos^{A549}, se procedió a evaluar la citotoxicidad de los Pd-Exos^{A549} y los Pd-Exos^{U87-MG} en los cultivos celulares de células cancerosas A549 y U87-MG. Para ello, células A549 y células U87-MG se sembraron en una placa de 96 pocillos. Pasadas 24 horas, las células A549 se incubaron con 100 µL conteniendo 0,2; 0,4 y 0,6 µg de Pd-Exos^{A549} durante 6 horas. Por su parte, 0,26; 0,53 y 0,8 µg de Pd-Exos^{U87-MG} se pusieron en contacto con los cultivos de U87-MG durante el mismo tiempo. La cantidad de Pd-Exos incubados con ambas líneas celulares fue diferente con el fin de normalizar los exosomas añadidos por la cantidad de células sembradas. Pasado este tiempo, se cambió el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con PBS. Al cabo de 5 días, se añadió el reactivo Alamar Blue y se estimó la viabilidad siguiendo el protocolo descrito en el capítulo general de materiales y métodos.

7.3.1.4. Estudio de internalización celular de Pd-Exos por microscopía confocal

La capacidad de internalización de los Pd-Exos^{A549} se estimó por microscopía confocal. Para ello, se sembraron las células sobre cubreobjetos previamente depositados en una placa de 24 pocillos tal y como se detalla en el capítulo 3. Pasadas 24 horas, se añadió 1 µg de Pd-Exos^{A549} y se dejaron en contacto con las células durante 1,2,4,6 y 24 horas. Las células se fijaron y se marcaron con phalloidina-Alexa488 y DRAQ5 para ser finalmente visualizadas bajo el microscopio confocal tal y como se ha

mencionado. Se realizaron adquisiciones en dirección Z para evaluar la presencia de los Pd-Exos en el interior del citoplasma celular (visualizados por reflexión de la luz incidente).

También se realizó un ensayo de co-localización por microscopía confocal de los Pd-Exos con la ruta endosomal y/o lisosomal (ver capítulo de materiales y métodos general). Resumidamente, para el marcaje de los endosomas y exosoma, las células se sembraron e incubaron con 1 μg Pd-Exos durante 6 horas. Pasado este tiempo, se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con PFA al 4 %. Los endosomas y exosomas se marcaron con el anticuerpo CD63 conjugado a Alexa488 y los núcleos con DRAQ5. Por otro lado, el marcaje de los lisosomas se realizó tras la incubación de los cultivos celulares con 1 μg Pd-Exos durante 6 horas. Para ello, se empleó la sonda LysoTrackerTM. Una vez marcados los lisosomas las células se fijaron y los núcleos se tiñeron con DRAQ5. En ambos tipos de preparaciones, los Pd-Exos fueron directamente visualizados por reflexión de la luz incidente.

7.3.1.5. Toxicidad de las moléculas 3 y 4 en células A549 y U87-MG

Antes de llevar a cabo los ensayos de catálisis intracelular, se determinó la concentración efectiva media (EC₅₀) de los compuestos 3 y 4 (del profármaco y del fármaco, respectivamente) en cultivos de células A549 y U87-MG. Para ello, ambas líneas celulares se sembraron sobre una placa de 96 pocillos y se dejaron en mantenimiento durante 24 horas. Pasado este tiempo, se cambió el medio de cultivo por medio conteniendo los compuestos 3 y 4 a unas concentraciones desde 0,003 hasta 100 μM . Se utilizaron como control células tratadas con DMSO al 0,1 % (v/v). Pasados 5 días, se determinó la viabilidad metabólica por el test Alamar Blue siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Todas las condiciones experimentales se normalizaron con las células sin tratamiento, considerado como una viabilidad del 100 %.

7.3.1.6. Estudio de la posible sinergia entre la molécula 3 y los Pd-Exos

Para evaluar los posibles efectos sinérgicos entre el compuesto 3 y los Pd-Exos, las células A549 se sembraron en una placa de 96 pocillos. Posteriormente, se añadieron los Pd-Exos^{A549} a una concentración de 0,4 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ durante 6 horas. Pasado este tiempo, con el objetivo de eliminar los exosomas no internalizados, se lavaron las células dos veces con PBS y se añadió medio de cultivo fresco conteniendo DMSO (0,1 % v/v) o el compuesto 3 (0,025 a 0,2 μM). Las células tratadas con el compuesto 3 se utilizaron como control positivo. Pasados 5 días, se determinó la viabilidad celular por el kit Alamar Blue.

7.3.1.7. Activación del profármaco intracelularmente en células A549

En primer lugar, se realizó un ensayo control con los Exos^{A549} (sin contener las PdNSs en su interior) para verificar que la reacción bioortogonal estaba mediada por estas nanoestructuras catalíticas. Para ello, las células A549 se sembraron de nuevo en pocillos de una placa de 96 pocillos y se añadieron Exos^{A549} a una concentración de 0,4 µg/100 µL. Pasadas 6 horas, estos pocillos se lavaron con PBS dos veces para eliminar los Exos^{A549} no internalizados y se trataron o con DMSO (0,1 % v/v) o con el compuesto 4 (0,2 µM). Células tratadas con los compuestos 3 y 4 (en ausencia de Exos^{A549}) se consideraron como control positivo y negativo, respectivamente. Pasadas 5 días, se determinó la viabilidad celular por el ensayo Alamar Blue.

Para comprobar la activación del compuesto 4 mediada por la reacción de transformación de este compuesto al compuesto 3 a través del catalizador Pd-Exos^{A549}, las células se sembraron como se ha comentado anteriormente y se añadieron los Pd-Exos^{A549} a unas dosis de 0,2; 0,4 y 0,6 µg/100 µL. Pasadas 6 horas, estos pocillos se lavaron con PBS dos veces para eliminar los Pd-Exos^{A549} no internalizados y se añadió medio fresco conteniendo DMSO (0,1 % v/v) o el compuesto 4 (0,2 µM). Pocillos conteniendo células tratadas con los compuestos 3 y 4 (0,1 µM) pero en ausencia de los Pd-Exos^{A549} se utilizaron como control positivo y negativo, respectivamente. Pasados 5 días, se determinó la viabilidad celular.

7.3.1.8. Actividad catalítica de los Pd-Exos^{A549} vs Pd-Exos^{U87-MG}

Dado que en esta sección se han empleado Pd-Exos derivados de dos líneas celulares diferentes, el siguiente objetivo fue comparar la actividad catalítica de ambos tipos de exosomas. Para ello 2 µg de Pd-Exos^{A549} y Pd-Exos^{U87-MG} se añadieron a 500 µL de una solución conteniendo el compuesto 1 (100 µM), para alcanzar una concentración final de 0,4 µg Pd-Exos/100 µL. Las mezclas se agitaron a 700 g a 37 °C, y las reacciones se monitorizaron pasadas 24 y 48 horas utilizando un lector PerkinElmer En Vision 2120 (ex/em 540/590 nm). El compuesto 1 (100 µM), los Pd-Exos^{A549} y Pd-Exos^{U87-MG} (0,4 µg/100 µL) incubados por separado, se emplearon como controles negativos. El compuesto 2 (100 µM) se usó como control positivo y el porcentaje de conversión se estimó tomando la intensidad del compuesto 2 como referencia.

Para analizar la activación intracelular de la prodroga en células A549 y U87-MG, los cultivos se sembraron de nuevo en una placa de 96 pocillos. Pasadas 24 horas las células se incubaron con medio de cultivo enriquecido con Pd-Exos^{A549} y Pd-Exos^{U87-}

7. Exosomas y nanopartículas: Agente terapéutico

^{MG} (0,4 µg/100 µL y 0,53 µg/100 µL, para normalizar la cantidad de exosomas añadidos por cantidad de células sembradas). Pasadas 6 horas de incubación, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco conteniendo DMSO (0,1 % v/v) o el compuesto 4 (0,2 µM). Las células tratadas con el compuesto 3 y 4 en ausencia de los Pd-Exos se consideraron como controles positivo y negativo, respectivamente. Pasados 5 días, se estimó la citotoxicidad metabólica por el método Alamar Blue.

7.3.1.9. Ensayo de competición

Para realizar este ensayo, se sembraron células A549 en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 24 horas. Posteriormente, se reemplazó el medio de cultivo por medio complementado con los Pd-Exos^{A549} a una dosis de 1,4 µg/100 µL (calculada para normalizar la dosis de Pd-Exos añadidos por el número de células sembradas) y con ácido cumarínico suberilánido hidroxámico (C-SAHA) a una concentración de 1 µM durante 6 horas. El compuesto C-SAHA es un inhibidor de la histona deacetilasa (HDAC) altamente fluorescente alrededor de los 450 nm. Sin bien, su fluorescencia se apaga cuando se une a estas proteínas diana.³⁵³ Cuando esta molécula se desplaza de sus proteínas diana debido a la presencia de otro inhibidor competitivo, se produce un incremento en la intensidad de fluorescencia intracelular que puede ser medida con ayuda de un citómetro de flujo (ex/em 405/250 nm).

Pasado el tiempo de incubación, se lavaron las células dos veces con PBS para eliminar los exosomas remanentes en el medio y se trataron con medio fresco conteniendo bien DMSO (0,1 % v/v) o el compuesto 4 (0,2 µM). Además, se emplearon células A549 tratadas con los compuestos 3 y 4 (0,2 µM) como controles positivo y negativo, respectivamente. Células tratadas con el compuesto 3 a diferentes dosis (0,2; 0,1; 0,03; 0,02 y 0,01 µM) se utilizaron para realizar una recta estándar de concentraciones. Pasadas 12 horas de incubación, las células se lavaron y su fluorescencia se analizó por citometría de flujo (Ex/Em 405/450 nm) utilizando un citómetro BC LSRFortessa X-20.

7.3.2. Resultados y discusión

7.3.2.1. Espectros fluorescentes de los sensores 1 y 2

En primer lugar, se comprobaron las propiedades catalíticas de los Pd-Exos^{A549} con el sensor 1 (proresofurina) diseñado para transformarse en el compuesto fluorescente resofurina (sensor 2) a través de una reacción de O-depropargilación. Como indica la **figura 7.8.A** (espectros de fluorescencia de los sensores 1 y 2 entre 460-650 nm), el compuesto 1 presentó una fluorescencia despreciable cuando era excitado

7. Exosomas y nanopartículas: Agente terapéutico

con un diodo emisor de luz blanca, comparado con el sensor 2, que presentó un pico máximo de fluorescencia a 590 nm (200 veces superior al del compuesto 1). Este hecho se debe a un bloqueo de la conjugación electrónica a través de la alquilación de los grupos OH de los grupos fenol. La **figura 7.8.B** muestra disoluciones de los sensores 1 y 2 (25 μ M, pH 7,4) en PBS, así como una disolución control de PBS (utilizado como blanco).

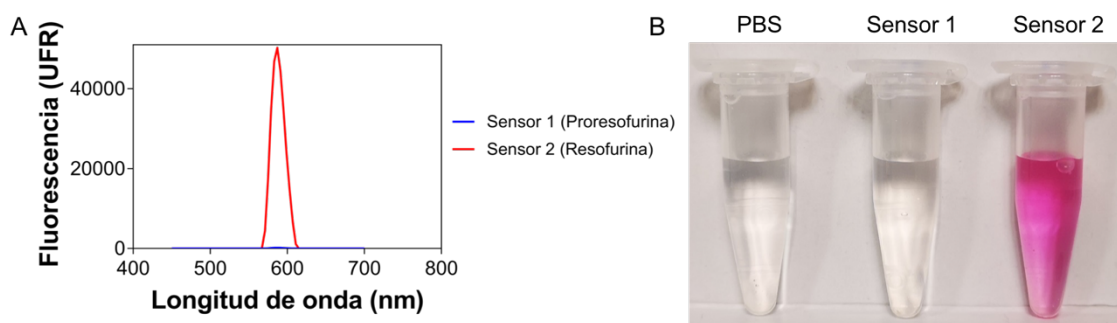


Figura 7.8. A) Espectro de fluorescencia de los sensores 1 (Proresofurina) y 2 (Resofurina), ambos a una concentración de 25 μ M en PBS. B) Viales conteniendo soluciones de PBS, del sensor 1 y del sensor 2.

7.3.2.2. Propiedades catalíticas de los Pd-Exos *ex vitro*

Una vez conocidas las propiedades fluorescentes de los compuestos 1 y 2, se incubaron diferentes concentraciones de los Pd-Exos^{A549} (0,12; 0,16; 0,2 y 0,4 μ g/100 μ L) con 500 μ L del compuesto 1 (100 μ M) durante 16 horas en PBS a 37 °C (**figura 7.9.A**). La intensidad de fluorescencia de estas muestras se determinó a lo largo del tiempo con ayuda de un espectrofotómetro (ex/em 540/590 nm). Para saber el % de conversión, estos valores de fluorescencia se compararon con la fluorescencia del sensor 2 (**figura 7.9.B**). Tanto la fluorescencia del sensor 1 (100 μ M) sólo o incubado con 0,2 μ g/100 μ L de Exos^{A549} (sin PdNSs) fue empleada como control negativo. La **figura 7.9.B** demuestra como cuando el sensor 1 se incubó con los Pd-Exos^{A549} a diferentes concentraciones se producía un incremento en la emisión de fluorescencia. De hecho, cuando la proresofurina era incubada con las dosis de Pd- Exos^{A549} más elevadas (0,2 y 0,4 μ g/100 μ L) se obtuvieron rendimientos de cercanos a la conversión completa (mayores del 97 % después de 16 h). Por lo contrario, la **figura 7.9.B** indica como tanto para el sensor 1, como para el sensor 1 incubado con Exos^{A549}, no se detectó fluorescencia. En la **figura 7.9.C** se muestran secuencias de imágenes obtenidas por microscopía *time-lapse* durante 24 horas del sensor 1, del sensor 2 y del sensor 1 en presencia de Pd-Exos^{A549}. El compuesto 1 se mantuvo estable sin la emisión de fluorescencia a lo largo del tiempo (control negativo). El compuesto 2 se usó como como

7. Exosomas y nanopartículas: Agente terapéutico

control positivo (la emisión de fluorescencia se mantuvo constante a lo largo del tiempo). Por su parte, cuando el compuesto 1 no fluorescente se puso en contacto con los Pd-Exos^{A549}, apareció fluorescencia roja a lo largo del tiempo hasta alcanzar niveles comparables con el compuesto 2, indicando la rápida conversión catalítica del compuesto 1 no fluorescente en el compuesto 2 fluorescente en presencia de los Pd-Exos^{A549}.

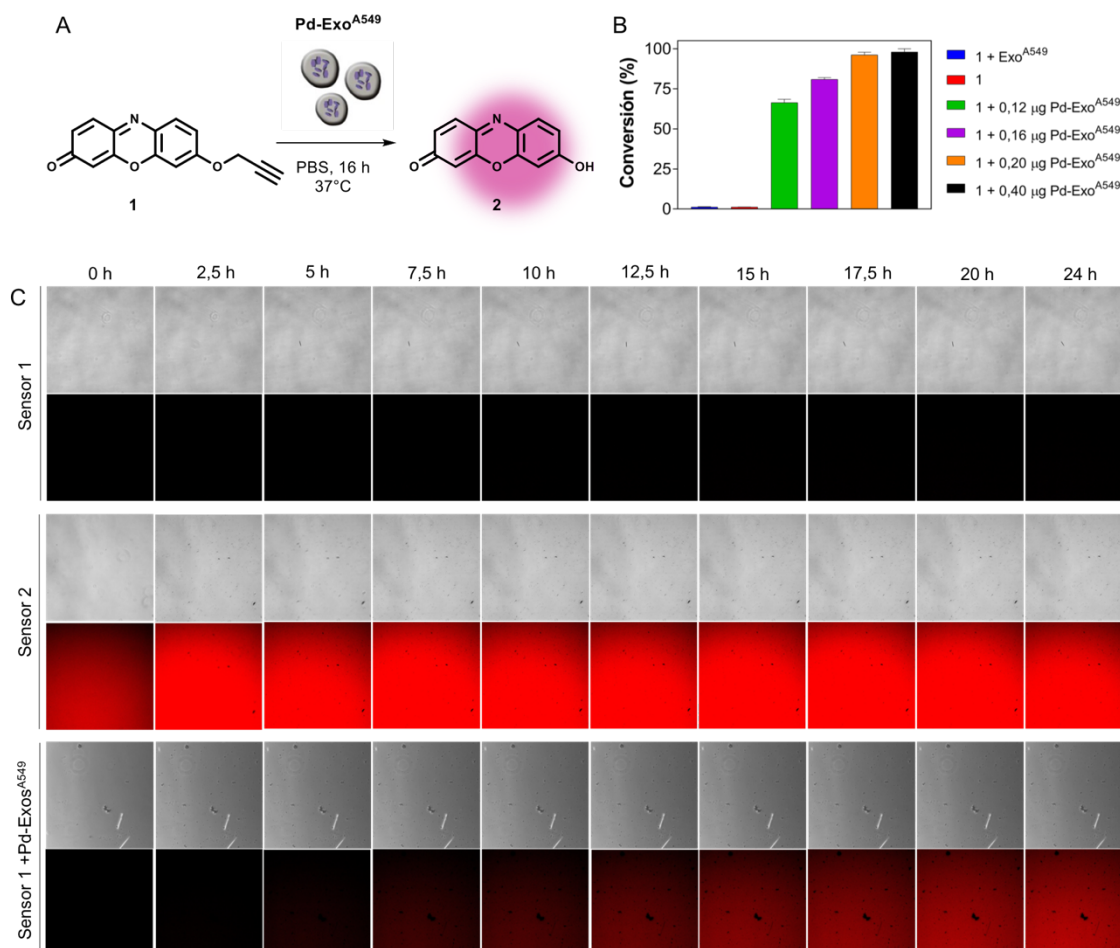


Figura 7.9. A) Conversión del compuesto no fluorescente 1 a resofurina altamente fluorescente mediada por los Pd-Exos^{A549} en condiciones fisiológicas (37°C, PBS y pH= 7,4). B) Eficacias de conversión pasadas 16 horas de incubación del compuesto 1 (100 µM) con los Pd-Exos^{A549} (0,12; 0,16; 0,2 y 0,4 µg/ 100 µL). C) Secuencias de microscopía *time-lapse* del compuesto 1, compuesto 2 y compuesto 1 con Pd-Exos^{A549}.

La **figura 7.10.A**, muestra que la velocidad de formación del compuesto 2 sigue una cinética clásica de Michaelis-Menten. Los parámetros cinéticos de la reacción se calcularon representando el logaritmo neperiano de la concentración del sensor 1 frente al tiempo (**figura 7.10.B**), obteniéndose cinéticas de reacción de pseudo primer orden ($K=0,1228 \pm 0,0049 \text{ s}^{-1}$) y un tiempo de vida medio de 5,64 horas para el rango de concentraciones probadas. Estos resultados van en concordancia con las velocidades

de obtenidas en las reacciones de O-depropargilación mediadas por catalizadores heterogéneos de Pd.^{350,352,354,366,367,368}

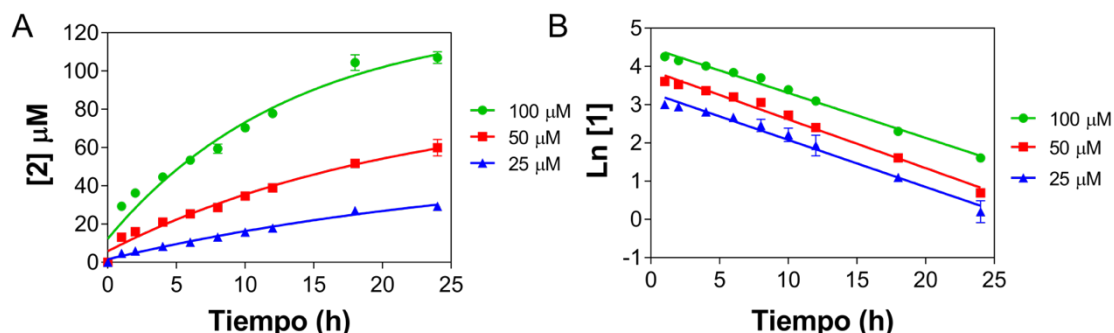


Figura 7.10. Estudio de la cinética de reacción de los Pd-Exos^{A549} (0,2 µg/100 µL) con diferentes concentraciones del compuesto 1 (25, 50 y 100 µM) en PBS y a 37 °C. A) Concentración del compuesto 2 generada a lo largo del tiempo, calculada a partir de la intensidad de fluorescencia medida. B) Representación del Ln de la concentración del compuesto 1 frente al tiempo.

También se evaluó la posible reutilización de los Pd-Exos^{A549} *in vitro*. Tras haber catalizado una vez la reacción del compuesto 1, los Pd-Exos^{A549} se recuperaron (por centrifugación) y se reusaron de nuevo incubándolos otra vez con este compuesto 1. La **figura 7.11** demuestra como el rendimiento de la reacción se vio reducido en un 45 % y un 20 % en los ciclos 2 y 3, respectivamente, lo que probablemente se debe a la recuperación incompleta de todo el catalizador tras los ciclos de centrifugación.

El compuesto 1 aislado y el compuesto 1 incubado con los Exos^{A549} se utilizaron como controles negativos. El compuesto 2 se usó como control positivo para obtener los porcentajes de conversión.

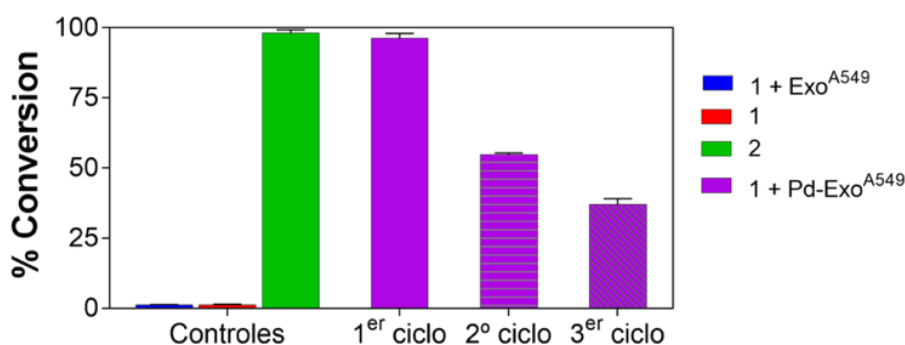


Figura 7.11. Ensayo de reutilización de los Pd-Exos^{A549} en la reacción de O-depropargilación del compuesto 1 (100 µM) para generar el compuesto 2 (altamente fluorescente) durante 3 ciclos de reutilización. La concentración de exosomas empleada fue de 0,2 µg/100 µL.

7.3.2.3. Ensayos de biocompatibilidad y de internalización celular de los Pd-Exos

Antes de llevar a cabo los ensayos de catálisis intracelular, se analizó la tolerabilidad de las células humanas A549 y U87-MG a la exposición de los Pd-Exos^{A549}

y de los Pd-Exos^{U87-MG}. La **figura 7.12** muestra la viabilidad celular de los cultivos de células A549 expuestos a 0,2; 0,4 y 0,6 μg Pd-Exos^{A549}/100 μL y de cultivos de células U87-MG incubados con 0,26; 0,53 y 0,8 μg Pd-Exos^{U87-MG}/100 μL durante 6 horas. Posteriormente, se cambió el medio de cultivo y pasados 5 días se analizó la viabilidad celular. Estos resultados revelaron que ni los Pd-Exos^{A549} ni los Pd-Exos^{U87-MG} presentaban citotoxicidad celular incluso a las dosis más elevadas utilizadas (**figura 7.12**).

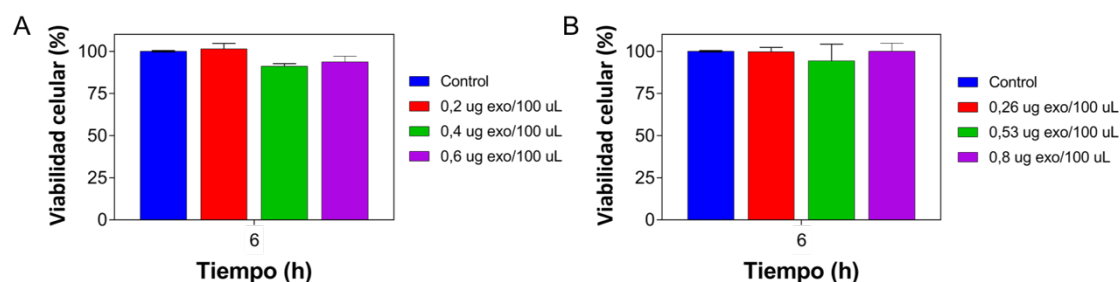


Figura 7.12. Estudio de la viabilidad celular de células A549 expuestas a Pd-Exos^{A549} y Pd-Exos^{U87-MG}.

Con el fin de encontrar el tiempo de incubación óptimo para realizar los ensayos de catálisis intracelular, la internalización de estas vesículas se estudió por microscopía confocal. Los cultivos de células A549 se trataron con Pd-Exos^{A549} durante diferentes tiempos (1, 2, 4, 6 y 24 h), las células se fijaron y se marcaron fluorescentemente los filamentos de actina con faloidina-488 (verde) y el núcleo con DRAQ5 (azul). Los Pd-Exos^{A549} en el interior celular se observaron directamente por reflexión de la luz incidente (ex/em 488/490 nm) y están indicados como puntos rojos. La **figura 7.13** recoge imágenes representativas de los cultivos tratados con los Pd-Exos^{A549} a diferentes tiempos.

En el canal de los Pd-Exos^{A549} (rojo) así como en el canal de luz transmitida puede observarse el Pd contenido en el interior de las vesículas. En el caso del canal rojo, debido a las propiedades inherentes de reflexión de este material y el caso de la luz transmitida, dada su coloración oscura. Al observar las ampliaciones de las imágenes que contienen la superposición de todos los canales, así como las proyecciones ortogonales generadas a partir de las adquisiciones en dirección Z de las células incubadas con los Pd-Exos, puede concluirse que pasadas 6 horas, se encontraba una cantidad máxima de Pd-Exos en el interior del citoplasma de las células.

7. Exosomas y nanopartículas: Agente terapéutico

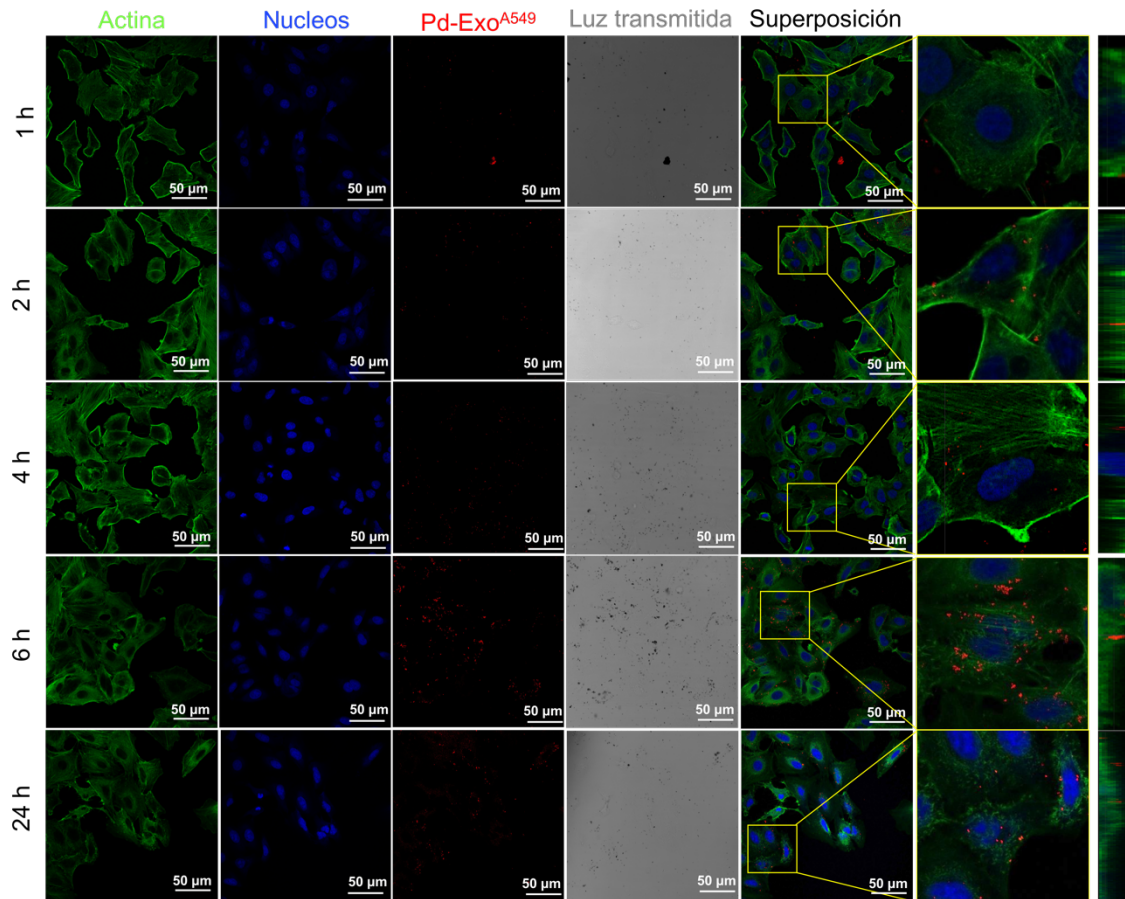


Figura 7.13. Imágenes de microscopía confocal de las células A549 incubadas con los Pd-Exos^{A549} durante 1,2,4,6 y 24 horas. Los filamentos de actina están marcados con faloidina (verde), los núcleos con DRAQ5 (azul) y los Pd-Exos^{A549} se visualizaron directamente por reflexión de la luz incidente (rojo).

Finalmente, se evaluó la presencia de los Pd-Exos^{A549} tanto en la ruta endosomal como en la ruta lisosomal. Para garantizar que las PdNSs sigan siendo catalíticamente activas y, por tanto, capaces de llevar a cabo la catálisis intracelular, es necesario que el estado de oxidación nativo de las PdNSs no se vea modificado, y para ello es preferible evitar que los Pd-Exos^{A549} sigan la ruta lisosomal (compartimentos celulares ácidos cuya misión es degradar las proteínas y/o componentes celulares, así como los cuerpos extraños tóxicos o moléculas que ya no son de utilidad para la célula). La **figura 7.14** muestra imágenes de microscopía confocal de cultivos de células A549 control y de células incubadas durante 6 horas con los Pd-Exos^{A549} marcando por un lado la ruta endosomal y los exosomas con CD63-Alexa488 y, por otro lado, tiñendo los lisosomas con la sonda celular lisotracker. Cuando se marcó la ruta endosomal con el anticuerpo CD63 en presencia de los Pd-Exos pueden observarse claramente píxeles morados/violetas, correspondientes a la presencia en el mismo pixel de marcaje rojo (por reflexión de la luz de los Pd-Exos) y azul (endosomas y exosomas). Estos resultados indican la co-localización de los Pd-Exos^{A549} en el interior de la ruta

7. Exosomas y nanopartículas: Agente terapéutico

endosomal y exosomal. Por lo contrario, cuando se marcaron los lisosomas, apenas se observaron puntos de co-localización (morados), y únicamente pudieron visualizarse *spots* rojos y azules segregados, evidenciando que los Pd-Exos no se encontraban presentes en la ruta lisosomal tras 6 horas de contacto con las células.

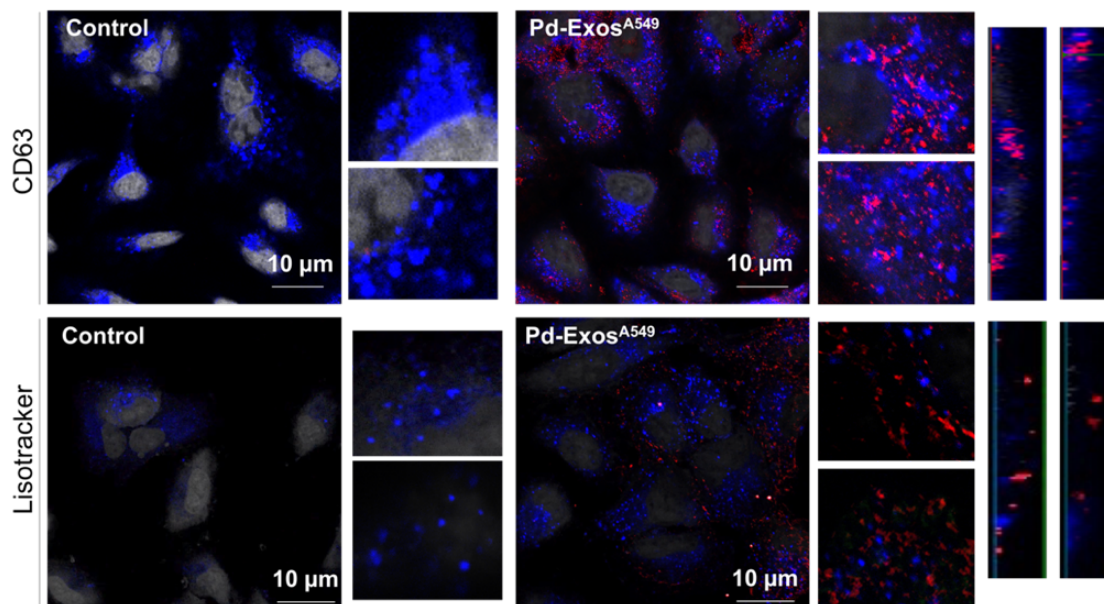


Figura 7.14. Fotografías de microscopía confocal para evaluar la localización intracelular de los Pd-ExosA549 tras ser incubados con las células A549 durante 6 horas. También se incluyen imágenes de células control (sin tratar). En la parte superior se muestran marcadas todas las vesículas positivas para CD63 (azul) y los Pd-Exos (en rojo). En la parte de abajo se recogen imágenes de los lisosomas en azul (marcados con lisotracker) y los Pd-Exos (en rojo).

7.3.2.4. Síntesis de un profármaco del Panobinostat®

Una vez verificada la gran capacidad catalítica *ex vitro* de los Pd-Exos, así como su elevada biocompatibilidad y su localización en el interior celular, nuestros colaboradores de la Universidad de Edimburgo sintetizaron un profármaco del Panobinostat® susceptible de ser catalíticamente modificado por el Pd. El Panobinostat® es un fármaco antitumoral aprobado en 2015 por la EMA para el tratamiento del mieloma múltiple. Actualmente está en ensayos clínicos para otros tipos de cánceres, incluyendo por ejemplo el carcinoma de pulmón de células pequeñas. Este fármaco es un inhibidor de la HDAC, un tipo de enzima cuya función es eliminar los grupos acetilo de los aminoácidos lisina presentes en las histonas. Esta desacetilación de las histonas es necesaria para el desarrollo y el crecimiento de las células tumorales a través del silenciamiento de genes que participan en la inhibición del crecimiento del tumor, y, por otro lado, de la sobreexpresión de proteínas implicadas en la proliferación, en la apoptosis y en la diferenciación celular. El desarrollo de fármacos que bloqueen este proceso de desacetilación de las histonas permite controlar el crecimiento celular

y la progresión del tumor. Sin embargo, hoy en día el principal reto es incrementar la selectividad de estos fármacos para disminuir los efectos secundarios y aumentar su tolerabilidad, ya que los inhibidores de las HDAC frecuentemente generan grandes daños sistémicos como diarreas, arritmias, mielosupresión o problemas cardíacos. Por tanto, a pesar de que hay varios ensayos clínicos para el tratamiento de diferentes cánceres, su uso está limitado por los efectos secundarios que presenta. Para solucionarlo, las principales líneas de investigación actuales se centran en el desarrollo de nuevos vehículos de entrega de estos fármacos epigenéticos de manera selectiva en las células tumorales diana con el objetivo de aumentar su tolerabilidad y su eficacia antitumoral. En este trabajo en lugar de buscar un nuevo vector transportador del fármaco, hemos desarrollado una estrategia basada en la síntesis de un derivado no citotóxico e inocuo (profármaco, compuesto 4) del Panobinostat® (compuesto 3). El compuesto 4 (profármaco), que sería convertido selectivamente en el interior de las células que contengan Pd-Exos, presenta una baja capacidad de inhibición de las HDACs y al mismo tiempo es susceptible de ser modificado por el Pd para convertirse en el Panobinostat®.

Para la potencial aplicación de los Pd-Exos como vectores de catálisis bioortogonal, es esencial que estas vesículas con las PdNSs en su interior sean capaces de mediar la activación de una sustancia bioactiva (prodroga) en el interior de estas células diana A549. En primer lugar, se diseñó un profármaco (compuesto 4) del Panobinostat® (compuesto 3) siguiendo la estrategia detallada en el **anexo 4**. Dado que el grupo hidroxamato quelante de Zn del Panobinostat® tiene un papel clave en su mecanismo de acción como agente citotóxico,³⁵³ se diseñó el derivado O-alquil hidroxamato para reducir su capacidad de inhibir las HDACs y al mismo tiempo, hacerlo susceptible de ser modificado por un catalizador de Pd (compuesto 3).

Antes de evaluar la eficacia de generación del Panobinostat® a partir del compuesto 4 por parte de los Pd-Exos en el interior celular, se estudiaron las propiedades antiproliferativas de los compuestos 3 y 4 aislados (tanto en células A549 como en células U87-MG). Las células se trataron con diferentes concentraciones (desde 0,003 hasta 100 μ M) de ambos compuestos durante 5 días. Comparando las curvas de dosis respuesta de los compuestos 3 y 4 puede comprobarse como la alquilación del grupo hidroxamato del Panobinostat®, dio lugar a la generación de un profármaco con una reducción considerable de su actividad citotóxica en ambas líneas celulares (**figura 7.15**). Concretamente, se obtuvo una EC50 (concentración de fármaco necesaria para producir la mitad del efecto máximo) de 36 y 73 nM para el Panobinostat® en células A549 y U87-MG, respectivamente. Por lo contrario, cuando

ambos tipos celulares se incubaron con el profármaco 3, la EC₅₀ obtenida era significativamente superior (más de 20 y 30 veces mayor), siendo 758 nM y 2,5 μ M para células A549 y U87-MG, respectivamente.

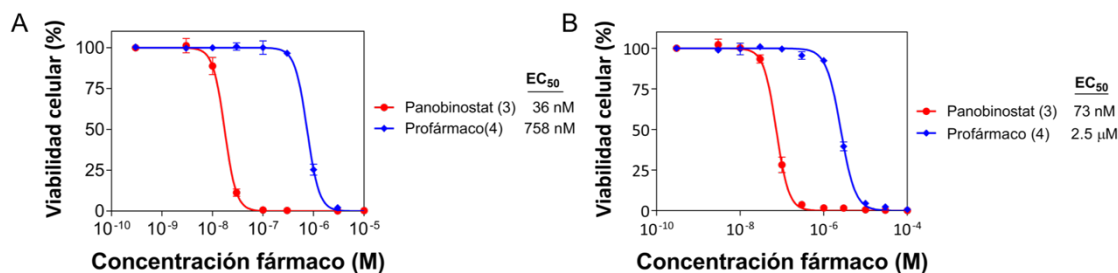


Figura 7.15. Curvas de dosis-respuesta de células A) A549 y B) U87-MG incubadas con el compuesto 3 (Panobinostat®) y el compuesto 4 (profármaco).

7.3.2.5. Actividad catalítica de los Pd-Exos^{A549}

A continuación, comprobó que esta disminución de la viabilidad celular era debida a la transformación del compuesto 4 (inactivo) al compuesto 3 (citotóxico) mediada en el interior celular por los Pd-Exos catalíticos de manera selectiva con un tropismo determinado por la célula secretora de origen. La **figura 7.16.A** muestra un estudio realizado para comprobar que no había una citotoxicidad sinérgica cuando los Pd-Exos se ponían en contacto con el Panobinostat® (compuesto 3). Es decir, este ensayo se llevó a cabo para corroborar que la presencia simultánea de los Pd-Exos^{A549} con el fármaco no suponía una incidencia mayor en la viabilidad celular que el efecto de la suma de ambos elementos individuales incubados separadamente.

La **figura 7.16.B** recoge un ensayo en el que se incubaron las células A549 con los Exos^{A549} (en ausencia del catalizador). Los resultados muestran como la viabilidad celular se mantuvo similar a la de las células control (100 % viabilidad) cuando los cultivos eran expuestos a los Exos^{A549}, al profármaco (4) y los Exos^{A549} en presencia de profármaco (4). Sin embargo, la viabilidad se redujo casi un 100 % cuando las células eran tratadas con el fármaco citotóxico Panobinostat®.

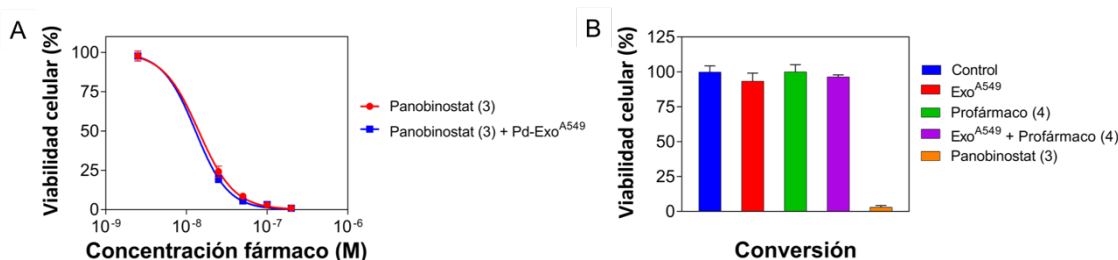


Figura 7.16. A) Evaluación de la posible sinergia entre el compuesto 3 (Panobinostat®) y los Pd-Exos^{A549}. B) Estudio control del potencial catalítico de los exosomas en ausencia de Pd (Exos^{A549}).

La **figura 7.17** demuestra, como cabía esperar, que el efecto catalítico es proporcional a la cantidad de catalizador presente: conforme aumenta la cantidad de Pd-Exos^{A549} de 0,2 a 0,4 $\mu\text{g}/100\ \mu\text{L}$, la viabilidad celular disminuye en mayor medida. Sin embargo, al aumentar de 0,4 a 0,6 $\mu\text{g}/100\ \mu\text{L}$, la viabilidad celular no se vio modificada, probablemente debido a que se había catalizado completamente el compuesto 4 al Panobinostat®.

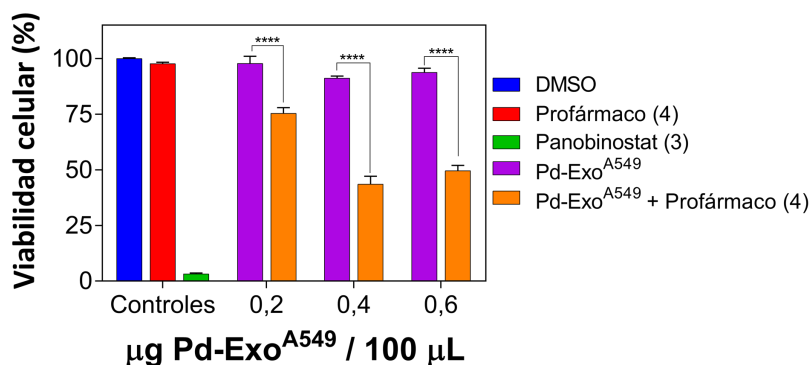


Figura 7.17. Catálisis intracelular mediada por Pd-Exos^{A549} incubados a diferentes concentraciones.

7.3.2.6. Catálisis bioortogonal dirigida intracelular mediada por los Pd-Exos

El siguiente objetivo de esta sección fue determinar si estos Pd-Exos^{A549} tenían tropismo hacia algún tipo celular en concreto (como, por ejemplo, por sus células parentales) y, por tanto, si estos Pd-Exos^{A549} eran capaces de mediar las reacciones de catálisis bioortogonal de manera específica y dirigida en células diana. Para realizar estos experimentos, se purificaron también exosomas de células de glioblastoma (U87-MG), y éstos se sometieron a la incubación con el precursor de Pd y al tratamiento con CO siguiendo el mismo protocolo descrito para los derivados de células A549. Además, se realizó un análisis MP-AES para estimar la cantidad de Pd en el interior de los mismos (normalizado por número de exosomas expresado como proteína total) y poder realizar los experimentos comparativos entre las vesículas derivados de las líneas celulares U87-MG y A549, siempre equiparando la cantidad de catalizador intra-exosomal, esto es, de Pd. Los resultados de MP-AES revelaron que los Pd-Exos^{U87-MG} contenían 0,45 μg de Pd/ μg de proteína exosomal total (comparado con los 0,64 μg de Pd/ μg de proteína exosomal total de los Pd-Exos^{A549}). Como demuestra la **figura 7.18**, los exosomas derivados de ambas líneas celulares presentaban una actividad catalítica *ex vitro* similar, mediando la conversión del compuesto 1 no fluorescente al compuesto 2 (fluorescente).

7. Exosomas y nanopartículas: Agente terapéutico

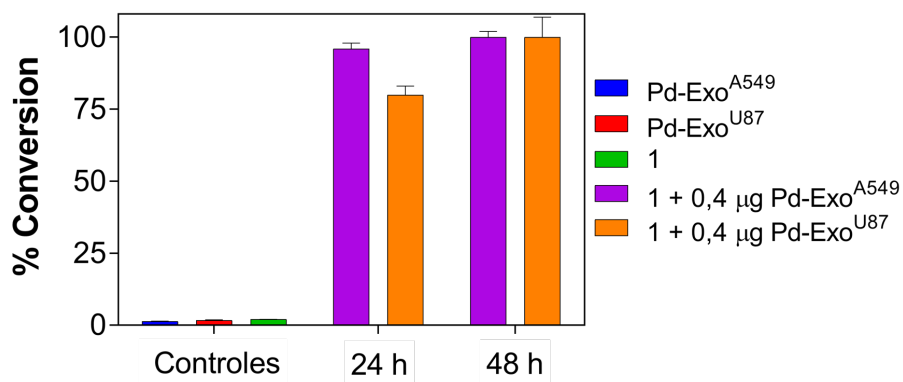


Figura 7.18. Conversión del compuesto no fluorescente 1 a resofurina altamente fluorescente (compuesto 2) mediada por los Pd-Exos^{A549} y los Pd-Exos^{U87-MG} en condiciones fisiológicas (37°C, PBS y pH= 7,4).

Los Pd-Exos^{A549} fueron incubados con dos líneas celulares: una de ellas la línea parental secretora de los exosomas (A549) y la otra, una línea no parental de células de glioblastoma (U87-MG). Las células A549 y U87-MG fueron incubadas durante 6 horas (tiempo máximo de internalización de los Pd-Exos obtenido por microscopía confocal) con 0,4 y 0,53 µg/100 µL de los Pd-Exos^{A549}, respectivamente (esta cantidad de exosomas incubados con ambas células fue diferente con el objetivo de normalizar la cantidad de catalizador por el número de células sembradas). Se eliminó mediante lavados el exceso de exosomas no internalizados y se incubó el compuesto 4 durante 5 días a una dosis de 0,2 µM. Pasado este tiempo se monitorizó el cambio en la viabilidad celular atribuido a la transformación del compuesto 4 al Panobinostat® mediada por los Pd-Exos (**figura 7.19.A**). Como controles negativos se establecieron los cultivos de células tratadas con el compuesto 4 (profármaco) en ausencia de los Pd-Exos^{A549}, y por otro lado células tratadas únicamente con los Pd-Exos^{A549}. Las células tratadas con Panobinostat® (compuesto 3) se consideraron control positivo. La **figura 7.19.B** muestra en primer lugar como el tratamiento de ambas líneas celulares bien con los Pd-Exos^{A549} por un lado y con el profármaco por otro (es decir, incubados separadamente) no provocó una disminución significativa de la viabilidad celular. Por lo contrario, cuando ambas líneas celulares eran tratadas con el Panobinostat®, la viabilidad de dichos cultivos disminuyó en más de un 90 %. Pero se observó una disminución significativa de la viabilidad celular (mayor del 50 %) cuando las células parentales (células A549) eran tratadas con los Pd-Exos^{A549} en presencia del profármaco 4. Contrariamente, las células U87-MG sometidas a las mismas condiciones, no vieron alterada ni modificada su viabilidad celular (debido a la insuficiente cantidad intracelular de Pd-Exos^{A549} en su interior). Este hecho evidenció la generación del producto citotóxico Panobinostat® (3) en el interior de las células A549, y, por tanto, confirmó la presencia de Pd-Exos^{A549} catalíticamente activos en el citoplasma de esta línea celular.

7. Exosomas y nanopartículas: Agente terapéutico

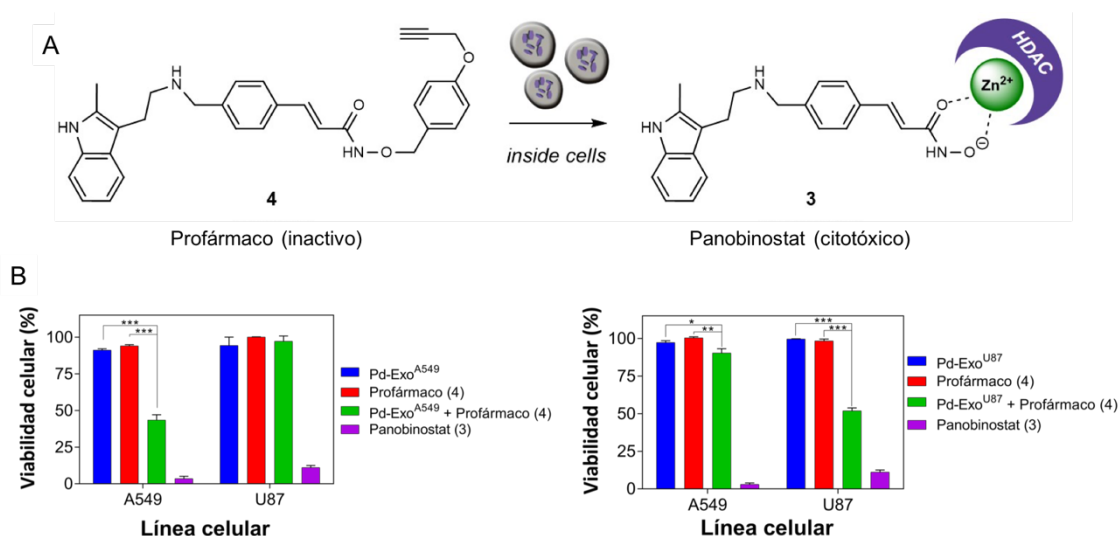


Figura 7.19. A) Catálisis intracelular mediada por los Pd-Exos para convertir el compuesto 4 (profármaco) al compuesto 3 clínicamente aprobado (HCAC). B) Catálisis intracelular mediada por los Pd-Exos^{A549} en células A549 y U87-MG (derecha) y catálisis intracelular mediada por los Pd-Exos^{U87-MG} en células A549 y U87-MG (izquierda).

Con el objetivo de estudiar la situación inversa (esto es si las células U87-MG internalizaban preferentemente Pd-Exos^{U87-MG} catalíticamente activos comparado con las células A549) se comprobó la generación en su interior de cantidades superiores del compuesto 3 a partir del profármaco, produciendo unos niveles de muerte celular elevados. En la gráfica de la derecha de la **figura 7.19.B** se muestra la misma tendencia observada para los Pd-Exos^{A549}: los Pd-Exos^{U87-MG} se capturaron preferentemente por sus células parentales en lugar de por la otra línea celular. Este tropismo mayoritario hacia sus células secretoras dio lugar a una elevada conversión intracelular del Panobinostat® a partir del profármaco 4, generando un efecto citotóxico selectivo en dichas células parentales. Al igual que en el caso de las células A549, cuando las células U87-MG eran incubadas con los Pd-Exos^{U87-MG} o con el profármaco de forma separada, no se observó una disminución de la viabilidad celular. Cuando estas células se ponían en contacto con el Panobinostat®, se observó un gran efecto citotóxico (control positivo). Estos resultados demuestran el tropismo preferencial de los Pd-Exos hacia sus células cancerosas parentales, y también enfatizan como ésta propiedad puede ser empleada para vehiculizar de forma selectiva y específica catalizadores bioortogonales activos al interior de células diana capaces de sintetizar directamente en el interior de las mismas un compuesto bioactivo y citotóxico antitumoral como el Panobinostat®.

Por último, se confirmó la producción *in situ* en el interior de las células del Panobinostat® (**figura 7.20.A**). Para ello se estudió el desplazamiento intracelular selectivo C-SAHA (un compuesto altamente fluorescente alrededor de los 450 nm el cual es inhibidor de las proteínas HDAC y cuya fluorescencia se desactiva cuando se

7. Exosomas y nanopartículas: Agente terapéutico

une las proteínas diana).³⁵³ Cuando esta molécula se desplaza de sus proteínas diana debido a la presencia de otro inhibidor competitivo, se produce un incremento en la intensidad de fluorescencia intracelular que puede medirse con ayuda de un citómetro de flujo (Ex/em 405/250 nm). En este caso, las células se incubaron con el complejo C-SAHA el cual se une a las HDAC celulares y la fluorescencia intracelular será muy baja. Por lo contrario, cuando se añaden los Pd-Exos^{A549} y el profármaco 4, se producirá la síntesis del Panobinostat® el cual es un inhibidor competitivo del C-SAHA por la unión a las HDAC, desplazando este último de las histonas y dando lugar a una intensidad alta de fluorescencia.

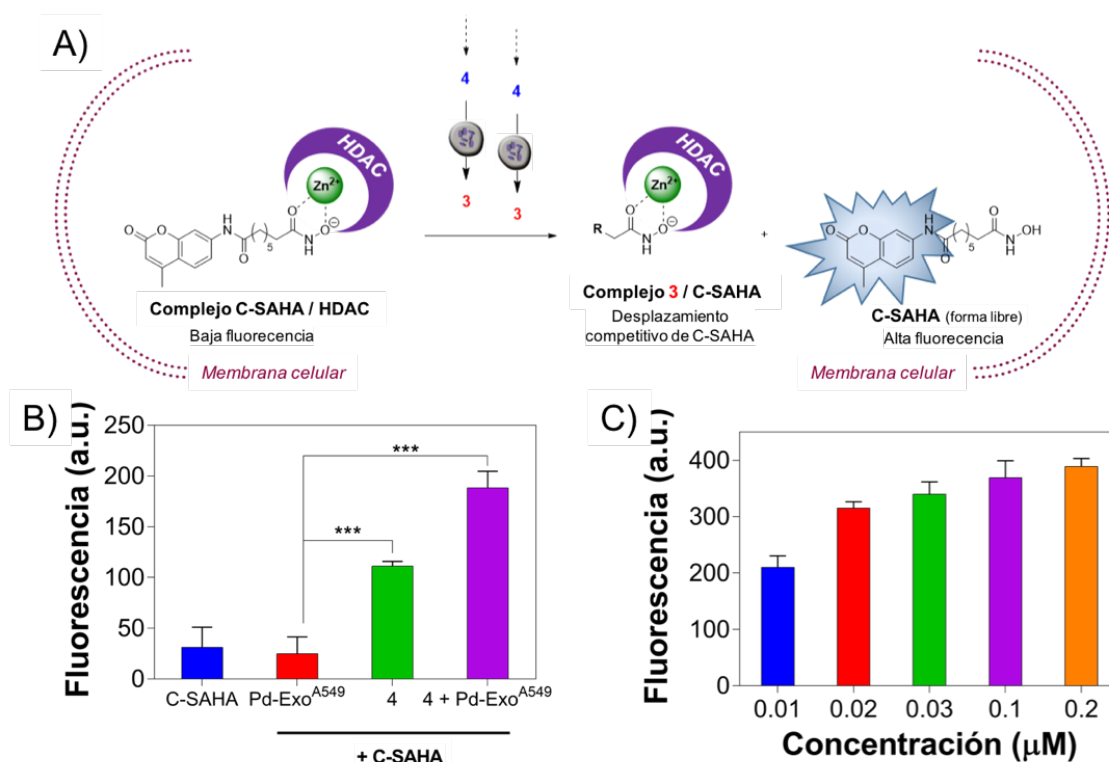


Figura 7.20. A) Estudio de fluorescencia de la conversión intracelular del compuesto 4 al compuesto 3 mediada por los Pd-ExosA549. Conforme se va generando el compuesto 3, el C-SAHA (unido a las HDAC y por lo tanto sin emitir fluorescencia dado que está apagado) se va desplazando del sitio catalíticamente activo del enzima, resultando en un aumento en los niveles de fluorescencia. B) Fluorescencia de células A549 medida por citometría de flujo al ser con C-SAHA y: DMSO, Pd-ExosA549, compuesto 4 o Pd-ExosA549 durante 6 h seguido del compuesto 4. C) Fluorescencia de células A549 medida por citometría de flujo tras someter a las células a un tratamiento con C-SAHA y el compuesto 3 a diferentes concentraciones.

La **figura 7.20.B** muestra como el tratamiento del cultivo celular con el complejo C-SAHA y los Pd-Exos^{A549} seguido de la adición del complejo 4 (profármaco), resultó en un incremento significativo de la fluorescencia comparado con la misma muestra en ausencia de Pd-Exos^{A549}, evidenciando de nuevo la síntesis del fármaco Panobinostat® en el interior de las células mediada por un catalizador de Pd selectivo.

7.3.3. Conclusiones de esta sección

El vector desarrollado en este trabajo reúne, por primera vez, las capacidades de direccionamiento y especificidad de los exosomas, y el concepto de catálisis bioortogonal desarrollado en las dos últimas décadas. El nuevo dispositivo catalítico empleado en este estudio, se ha generado a partir de exosomas derivados de células tumorales usando una metodología novedosa basada en la reducción de CO para generar PdNSs ultrafinas directamente dentro de las vesículas sin comprometer la especificidad ni funcionalidad de los mismos.

El desarrollo de vehículos de Pd que puedan catalizar reacciones intracelulares requiere vectores robustos capaces de internalizarse en las células con alta eficacia y compatibles con el complejo entorno intracelular (redox, pH, etc.). Este estudio demuestra que los Pd-Exos^{A549} son capaces de mediar la activación *in situ* del Panobinostat® en las células A549 del cáncer de pulmón, pero no en U87-MG, lo que ratifica la selectividad de la entrega del catalizador mediada por exosomas de las propias células. El uso de exosomas como Caballo de Troya para la administración de catalizadores en células tumorales, abre una oportunidad para el desarrollo de una nueva modalidad de terapia dirigida: catálisis de profármacos mediada por exosomas.

7.4. PEG-HGNs-Exos como vectores de hipertermia óptica *in vitro*

Hoy en día están emergiendo nuevas estrategias alternativas para tratar el cáncer, entre ellas las terapias basadas en luz (terapia fotodinámica). La terapia fotodinámica se basa en el uso de materiales sensibles a la luz de una determinada longitud de onda. Cuando estos fotosensibilizadores son irradiados, son capaces de mediar la muerte de las células cancerosas por ejemplo a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) causando una desestabilización del sistema redox de las células o bien a través de la generación de calor mediado por NPs (hipertermia óptica).

Concretamente, las terapias antitumorales por hipertermia óptica se basan en el empleo de NPs de metales nobles (generalmente oro) que cumpliendo unas determinadas condiciones geométricas, son capaces de absorber radiación de una longitud de onda determinada.³⁶⁹ Tiene especial interés terapéutico, por su mayor penetración, la luz del rango del NIR, que al absorberse se transforma en calor produciendo un aumento de temperatura. Esta elevación de la temperatura se utiliza para provocar una muerte celular de las células tumorales por apoptosis o necrosis, dependiendo de la frecuencia del láser, de la frecuencia del pulso, de la longitud de onda e incluso del tiempo de exposición. Dentro de todos los nanomateriales metálicos, las

7. Exosomas y nanopartículas: Agente terapéutico

AuNPs son ampliamente empleadas en las investigaciones basadas en hipertermia óptica, ya que presentan propiedades únicas físicas, químicas y ópticas. Concretamente, su potencial como agentes fototerapéuticos está asociado al fenómeno óptico denominado SPR.¹³⁰ El efecto SPR, ya mencionado en capítulos anteriores, consiste en la oscilación colectiva de los electrones de valencia (libres) del metal, de modo que cuando la frecuencia de la luz incidente coincide con la banda del espectro correspondiente a la frecuencia SPR de estas partículas, se genera un aumento de la temperatura en el medio que rodea a la partícula. Puesto que se pretende que la absorción de la luz se produzca en longitudes de onda del NIR, es necesario sintetizar el nanomaterial con una composición, tamaño y forma determinados, de manera que el máximo de absorción se produzca en esta zona del espectro. Por ejemplo, las nanoesferas de oro tienen el máximo de absorción en la región del visible, así que no serían susceptibles de ser usadas como vectores de hipertermia óptica. Sin embargo, otras nanoestructuras como las nanoesferas, los nanobastones o nanocajas (nanoestructuras cuadradas huecas de 45 nm de ancho con una pared delgada, porosa y robusta) tienen geometrías con un espectro de absorción que contiene un pico entre 800 y 820 nm, siendo candidatos ideales para mediar terapias basadas en hipertermia óptica.^{370,371,372}

Las HGNs son excelentes candidatas para mediar los procesos de hipertermia óptica porque además de su alta eficacia de absorción de la luz en el NIR, presentan una gran estabilidad coloidal, una baja toxicidad a las dosis utilizadas, una elevada biocompatibilidad y gran facilidad para conjugar diferentes biomoléculas o polímeros en su superficie.³⁷³ A lo largo de los últimos años, se han descrito numerosos nanomateriales con propiedades plasmónicas, como por ejemplo NPs núcleo-corteza de SiO₂ y Au. Estas NPs tienen un diámetro entre 50-150 nm de diámetro y están formadas por una capa de oro rodeando un núcleo de un material dieléctrico como por ejemplo, sílice; y presentan un pico de absorbancia en el NIR, cuya frecuencia de resonancia es fácilmente modificable variando el ratio entre el núcleo y la corteza.³⁷⁴ Varios autores encontraron una reducción en el tamaño de tumores subcutáneos *in vivo* cuando se administraban estas partículas intravenosamente seguidas de su irradiación con un láser NIR.^{375,376} Incluso, se están realizando ensayos clínicos aprobados por la FDA, utilizando partículas AuroShell® comercializadas por Nanospectra Biosciences, Houston, TX. Ensayos piloto con estas partículas en pacientes con cáncer de próstata han demostrado la acumulación de estos complejos de sílice y oro en los tumores.³⁷⁷ Además, también existe otro ensayo clínico para el tratamiento por ablación fototérmica de cánceres de cabeza y cuello recurrentes (clinicaltrials.gov NCT00848042). Otro de

7. Exosomas y nanopartículas: Agente terapéutico

los nanomateriales de oro más utilizados para fototerapia en tumores son los nanobastones de oro de menos de 50 nm de longitud, cuyas propiedades de SPR pueden controlarse cambiando el ratio entre longitud/diámetro del bastón. Von Maltzahn *et al.*, describieron la ablación fototérmica de tumores en ratones *nu/nu* tras administrárseles intravenosamente nanobastones de oro recubiertos con PEG. En este trabajo se observó una acumulación de estas partículas en la zona tumoral y una disminución del tamaño de los tumores cuando estos eran irradiados con un láser NIR.³⁷⁸

En esta Tesis Doctoral se han empleado HGNs capaces de absorber energía en la región NIR del espectro electromagnético, tal y como se ha demostrado en el capítulo 4, y disiparla en forma de calor debido a relajaciones electrón-electrón y electrón-fonón,^{379,380} lo que los convierte en candidatos excelentes para el tratamiento de tumores por hipertermia óptica.³⁸¹ A pesar de que las AuNPs son capaces de convertir muy eficazmente la luz NIR a calor, el empleo de hipertermia generalizada en todo el organismo produce daños en células y en tejidos sanos, y por ello es necesario desarrollar vehículos capaces de transportar las NPs única y selectivamente a células y tejidos diana para lograr un aumento de temperatura exclusivamente en la zona localizada donde se encuentre el tumor.³⁸² En los últimos años, en nuestro laboratorio se han funcionalizado estas partículas de oro huecas con polímeros como PEG, demostrando su incremento de internalización en células tumorales en comparación con las partículas desnudas.¹⁵⁶

Recientemente ha sido posible la encapsulación de estas partículas en el interior de células madre mesenquimales de médula ósea, utilizadas como “caballos de Troya” en ratones con tumores xenograft, permitiendo una mayor acumulación de las partículas en los tumores.¹⁷² En comparación, los exosomas no tienen es limitación y suponen una gran alternativa como vehículos para transportar NPs de hipertermia hasta los tumores.

Para esta sección, se seleccionaron los PEG-HGNs-Exos tanto derivados de células B16-F10 como de hpMSCs (PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} y PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs}, respectivamente) obtenidos a partir de la incubación de las partículas de oro con las células secretoras. A continuación, se recogen los resultados relacionados con el potencial terapéutico *in vitro* de estos PEG-HGNs-Exos como vectores de hipertermia óptima en diferentes cultivos celulares.

7.4.1. Experimental

7.4.1.1. Evaluación del potencial terapéutico *in vitro* de los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10}

F10

Con el objetivo de evaluar la capacidad de los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} para mediar la muerte celular por hipertermia óptica *in vitro*, se sembraron las células diana B16-F10 en placas multicanal de 48 pocillos a la densidad indicada en los materiales y métodos. Tras mantener las células en cultivo e incubarlas con 10 μg de los exosomas cargados con las partículas durante 24 h, se eliminó el medio de cultivo y se lavaron los cultivos dos veces con PBS para eliminar el exceso de exosomas no internalizados. A continuación, se añadió medio DMEM completo fresco y se irradiaron por la superficie (sin contacto) utilizando un colimador acoplado a un láser NIR (808 nm) a una potencia de 2 W. El láser utilizado que se muestra en la **figura 7.21** es un generador láser modelo MDL-H-808/2000 mW láser de diodo infrarrojo de 808 nm (Changchun New Industries Optoelectronics Technology Co., Ltd, Changchun, China).

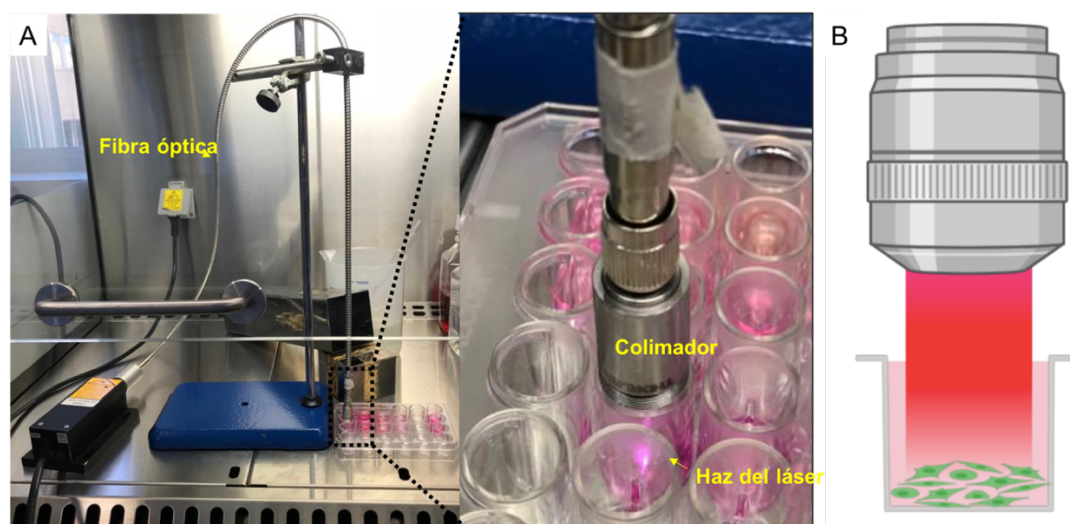


Figura 7.21. A) Montaje experimental del láser en condiciones estériles para irradiar los cultivos celulares, B) Esquema que ilustra el haz del laser irradiando las células en cultivo.

A la vez que las células eran irradiadas, se tomaron datos de la temperatura superficial en respuesta a la absorción y dispersión de la radiación NIR por parte de los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} con ayuda de un termómetro digital láser. La **figura 7.21** muestra el montaje experimental del láser, introducido en la campana de esterilidad para irradiar los cultivos celulares.

Para analizar la mortalidad mediada por el calentamiento de las partículas en el interior de los exosomas, las células viables y las dañadas se tiñeron con el kit LIVE/DEAD, siguiendo el procedimiento detallado en el capítulo de materiales y

métodos general. Finalmente, los cultivos celulares se lavaron dos veces con PBS y se visualizaron con un microscopio de fluorescencia invertido Olympus IX81. Para poder observar el pocillo entero, se realizó un multialineamientos de las fotos adquiridas con el objetivo 4x.

En los experimentos control, las células fueron sometidas a la misma manipulación, pero se incubaron con exosomas control (Exos^{B16-F10}, sin NPs en su interior).

7.4.1.2. Evaluación del potencial terapéutico *in vitro* de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs}

Para evaluar el efecto fototérmico selectivo de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} diferentes líneas celulares (células madre de placenta, células de melanoma B16-F1 y B16-F10, y monocitos) se sembraron en placas de 48 pocillos ($1,4 \times 10^4$) y se mantuvieron durante 24 horas en crecimiento. Posteriormente, se añadieron los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} derivados de células madre mesenquimales a las diferentes líneas celulares. La concentración de estos exosomas añadidos a cada pocillo fue estimada a partir del ratio entre la cantidad de células a partir de las cuales se habían aislado esos exosomas y el número de células tratadas. Además, se incluyó una condición experimental en la cual se añadió diez veces más de exosomas que los producidos por ese número de células. Para eliminar el posible calentamiento causado por los exosomas no internalizados en las células presentes en el medio de cultivo, las células fueron lavadas tres veces con PBS. Finalmente, las células fueron irradiadas durante 30 minutos con un láser NIR (808 nm) con una potencia de 2 W.

Una vez irradiadas las células con el láser NIR, se analizó la muerte celular causada por el calentamiento de los exosomas en el interior de las diferentes líneas celulares realizando de nuevo un marcaje LIVE/DEAD de células vivas y muertas con calceína-AM y EthD-1, respectivamente (el protocolo seguido se detalla en el capítulo 3). Las muestras fueron finalmente lavadas dos veces con PBS y analizadas bajo un microscopio de fluorescencia invertido (Olympus IX81). Paralelamente, se cuantificó la muerte celular causada por la ablación térmica de los exosomas irradiados con el láser NIR por citometría de flujo. Para ello, las células vivas y muertas fueron marcadas de nuevo con el kit LIVE/DEAD del mismo modo que para el análisis por microscopía y la muerte o viabilidad celular fue cuantificada por un citómetro BD FACSAria (BD Biosciences). Se analizaron también cultivos de células madre, B16-F1, B16-F10 y monocitos sin ser tratados con exosomas, sirviendo como control negativo.

Finalmente, también se realizó un co-cultivo de hpMSCs (previamente cargadas con las PEG-HGNs durante 24 horas) y células B16-F1. Para ello, 1×10^4 células de

ambos tipos celulares fueron co-cultivadas en una placa de 24 pocillos durante 24 horas para finalmente ser irradiadas y marcadas con LIVE/DEAD siguiendo el mismo protocolo que en los monocultivos.

7.4.2. Resultados y discusión

7.4.2.1. Evaluación del potencial terapéutico *in vitro* de los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10}

Los resultados demuestran como en primer lugar, este nuevo vector (exosomas cargados con PEG-HGNs) era capaz de generar un aumento de temperatura cuando se sometía a un láser en la región NIR. La **figura 7.22.A** muestra como se produjo un aumento de temperatura significativo al irradiar la solución con PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} comparado con los exosomas sin partículas (los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} fueron capaces de producir un incremento de $10,9 \pm 2,5$ °C frente al incremento de $6,5 \pm 1,2$ °C producido por los exosomas control). Tras 30 minutos de irradiación con el láser NIR, el incremento de temperatura aumentó aún más ($12,2 \pm 1,8$ °C frente a $6,8 \pm 1,6$ °C con los exosomas vacíos).

La morbilidad causada por la irradiación láser en cultivos celulares se evaluó mediante el kit LIVE/DEAD. Tras la incubación de las células con los exosomas cargados con las partículas y con exosomas control, se procedió a la irradiación de la monocapa de células B16-F10 durante 30 minutos (808 nm y 2 W). La aparición de fluorescencia verde viene determinada por la calceína, un indicativo de estabilidad de las membranas celulares y ausencia de muerte celular. Cuando el cultivo de células incubado con los exosomas cargados con las partículas se irradió con el láser de 808 nm, una parte de la monocapa celular en el centro del pocillo (coincidente con el spot del colimador del láser con el que se irradiaron), se vio interrumpida, hecho indicativo de la muerte celular producida en la zona irradiada con el láser. La viabilidad de las células del cultivo no irradiadas por el láser, no se vio afectada y se observan de color verde en las imágenes tomadas en el microscopio de fluorescencia tras llevar a cabo la tinción.

En contraste, en las células incubadas con los PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} no sometidas a la irradiación NIR, no se observó muerte celular. Del mismo modo, en los cultivos celulares irradiados a 808 nm en ausencia de exosomas con partículas, todas las células se tiñeron de calceína indicando una alta viabilidad, similar a las células no tratadas y no irradiadas (control negativo). Estos resultados se recogen en la **figura 7.22.B**.

7. Exosomas y nanopartículas: Agente terapéutico

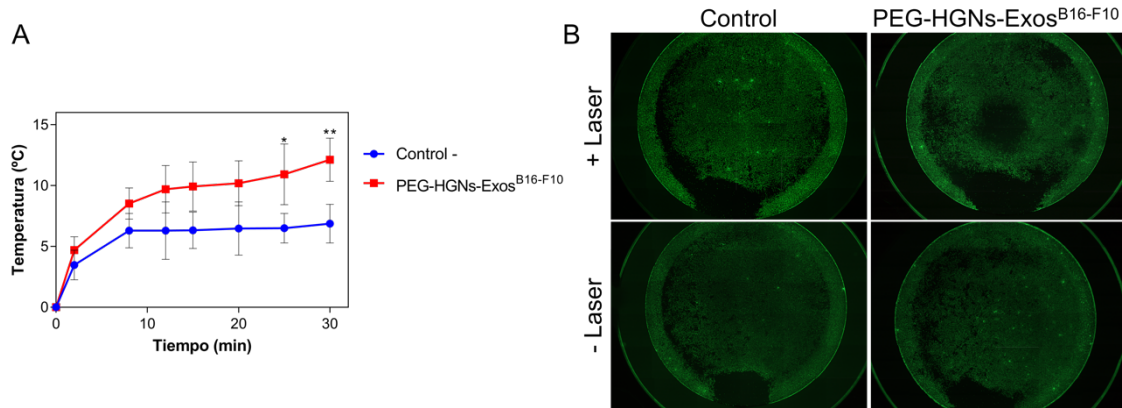


Figura 7.22. A) Control de la temperatura de los cultivos celulares incubados en ausencia y en presencia de PEG-HGNs-Exos^{B16-F10}. B) Fotografías de fluorescencia de cultivos de hpMSCs sometidos al marcaje con el kit LIVE/DEAD incubados en ausencia o presencia de PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} y sometidos o no al tratamiento con el láser.

7.4.2.2. Evaluación del potencial terapéutico *in vitro* de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs}

La **figura 7.23.A** muestra como la irradiación NIR no produjo una disminución de la viabilidad celular en los cultivos de células B16-F10, B16-F1 y THP1 tratados con los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} (únicamente se observó una disminución de la viabilidad de entre un 0 y un 20 %, similar a la obtenida por las células control, atribuida al manejo de la placa y al tiempo que las células se mantienen fuera de las condiciones de crecimiento). Por otro lado, se observó una disminución en un 50 % de viabilidad fue observada en las hpMSCs cuando estas eran incubadas con PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs}.

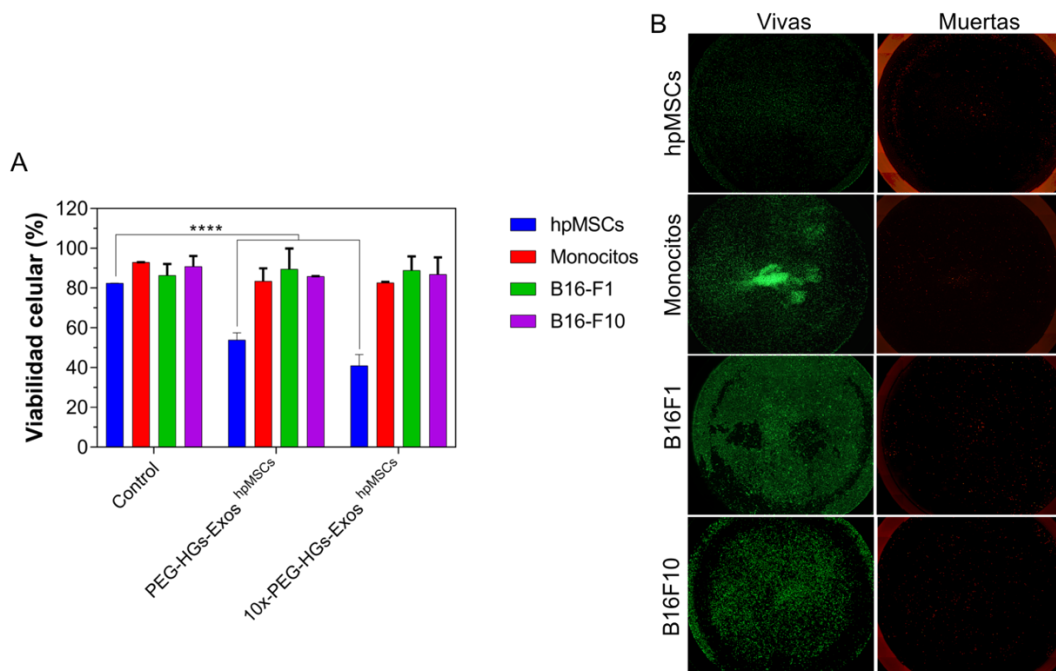


Figura 7.23. A) Resultados de citometría de flujo de células hpMSCs, monocitos, B16-F10 y B16-F1 tratadas con PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} a diferentes concentraciones y sometidas a la irradiación con el láser a 808 nm. B) Fotografías de fluorescencia de cultivos celulares marcados con el kit LIVE/DEAD tras su incubación con PEG-HGNs-Exos y la irradiación con el láser.

7. Exosomas y nanopartículas: Agente terapéutico

Se obtuvieron resultados cualitativamente similares en el microscopio invertido cuando se realizó el marcaje de las células vivas y muertas con el kit LIVE/DEAD (**figura 7.23.B**). En el canal verde (correspondiente con las células vivas), puede observarse una intensidad de fluorescencia mucho menor, indicativo de la muerte celular producida bajo la irradiación. Del mismo modo, en el centro del pocillo del canal rojo, se observan las células muertas. Además, en los pocillos tratados con una cantidad de exosomas 10 veces superior, se observó una disminución de la viabilidad de las hpMSCs mayor del 60 %, mientras que la viabilidad del resto de tipos celulares siguió sin verse afectada.

Finalmente, para confirmar esta selectividad en un entorno con coexistencia de dos tipos celulares, se realizaron co-cultivos de células B16-F1 y hpMSCs, estas últimas preincubadas con PEG-HGNs durante 24 horas. Los co-cultivos se mantuvieron durante 48 horas en crecimiento (un tiempo que se considera suficiente para que se produzcan numerosas expulsiones y re-captaciones de exosomas de ambos tipos de células) y fueron irradiados de nuevo con el láser NIR. En la **figura 7.24** puede observarse como en los co-cultivos control (en ausencia de partículas), no había muerte celular en ninguna de las líneas celulares tras ser irradiadas con el láser. Por lo contrario, cuando se irradiaban las placas de co-cultivos que contenían las hpMSCs preincubadas con las partículas, se produjo muerte de esta línea celular (rojo), mientras que las B16-F1 seguían vivas (verde). Este efecto fototérmico selectivo confirmó de nuevo que, gracias a la identidad aportada por los exosomas, estos eran preferentemente intercambiadas entre sus células parentales.

Los resultados de esta sección, junto con el análisis por MP-AES llevado a cabo para cuantificar la cantidad de oro dentro de cada población celular, así como las secuencias de imágenes obtenidas por *time-lapse* de co-cultivos de hpMSCs y THP1 (mostrado en capítulos anteriores) demuestran que los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} eran preferentemente capturadas por células receptoras hpMSCs en lugar de por otras células. Esto indica que los exosomas aportan una huella dactilar a las PEG-HGNs, la cual es reconocida por otra célula del mismo tipo, facilitando su internalización. Aunque algunos trabajos establecen que los exosomas pueden ser incorporados indistintamente por cualquier tipo celular,³⁸³ nuestros resultados concuerdan con otros estudios que sugieren que los exosomas tienen la capacidad de alcanzar células diana de forma selectiva, sirviendo como vehículos específicos.^{384,385,257}

7. Exosomas y nanopartículas: Agente terapéutico

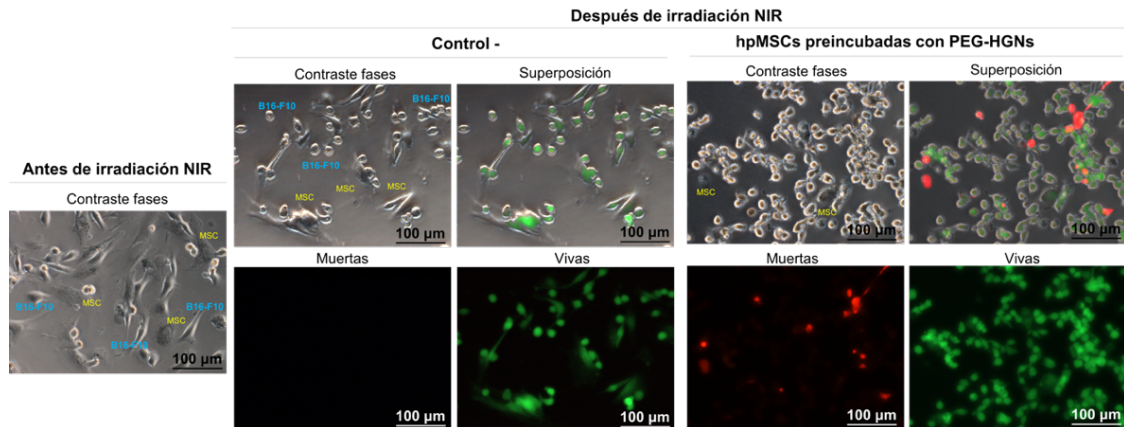


Figura 7.24. Co-cultivos de células hpMSCs (preincubadas con PEG-HGNs) y B16-F10, antes y después de ser irradiadas con el láser NIR. La composición de fotos recoge imágenes procedentes del marcaje LIVE/DEAD para marcar las células vivas y muertas, así como de contraste de fases.

Los resultados obtenidos también demuestran que las PEG-HGNs encapsuladas en el interior de los exosomas conservan sus propiedades ópticas, siendo susceptibles de ser irradiados con un láser NIR en condiciones fisiológicas, y promoviendo un aumento de la temperatura a nivel local y de causar la muerte celular. También, esta sección evidencia el potencial terapéutico selectivo y específico de los PEG-HGNs-Exos como vectores de hipertermia óptica. La alta especificidad aportada por los exosomas en los procesos de transferencia intercelulares, abre una nueva posibilidad para emplear estos vectores en aplicaciones terapéuticas dirigidas. Con la ventaja de la encapsulación de las NPs en su interior ayudaría a evitar el reconocimiento *in vivo* por el SFM.

7.4.3. Conclusiones de esta sección

Los vectores híbridos PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} y los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} son capaces de resonar en el NIR, absorbiendo energía al ser irradiados con un láser de 808 nm, transformando esta energía en calor y causando un aumento local de temperatura que produce la muerte celular *in vitro* cuando son irradiadas con el láser infrarrojo. En el caso de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} se ha demostrado como estos son específicamente capturados por sus células parentales, lo que permite realizar terapia fototérmica selectiva, dirigida únicamente a estas células diana, incluso cuando las células eran co-cultivadas con otras líneas celulares.

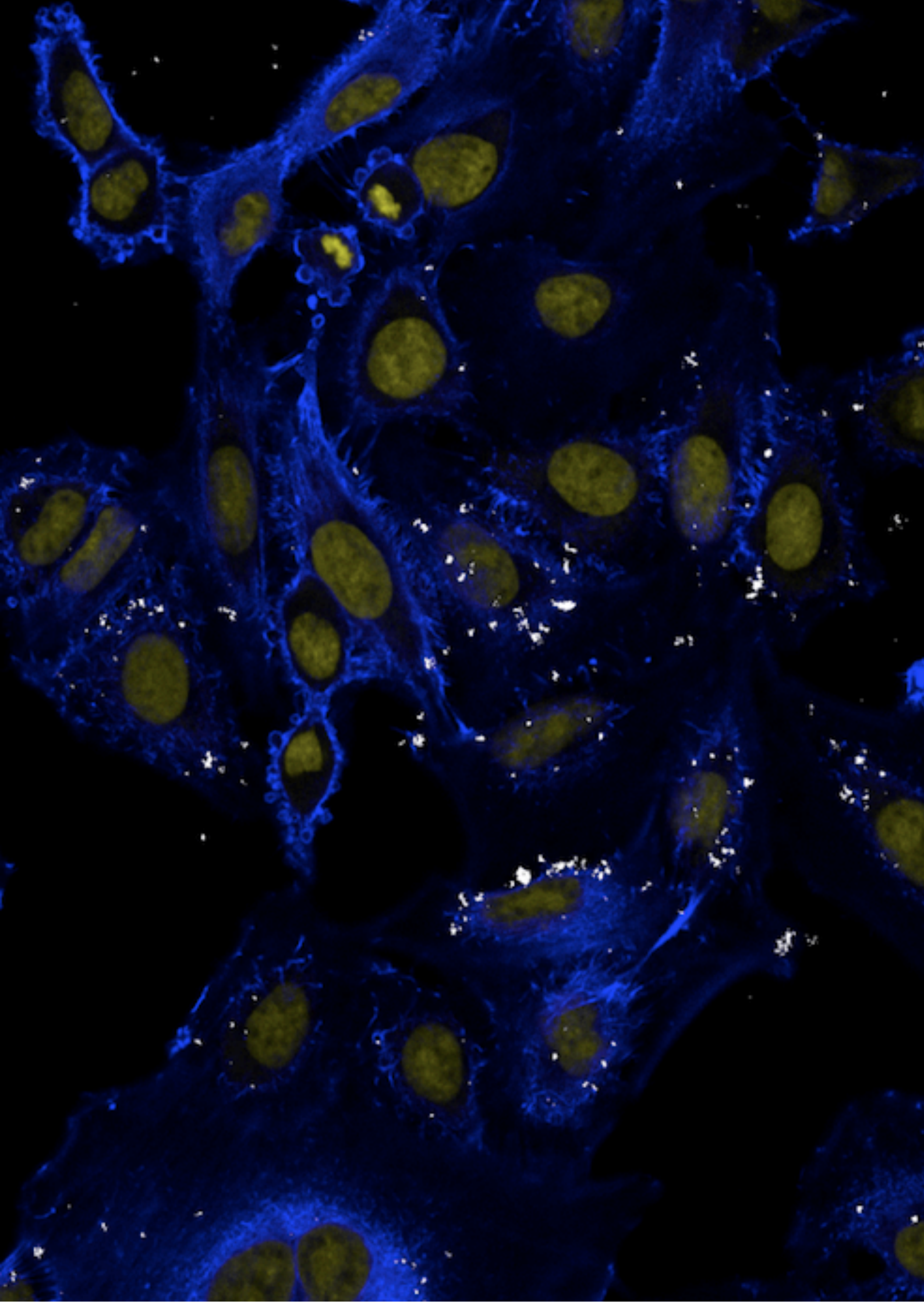


Imagen de microscopía confocal de células de cáncer de pulmón A549.
Marcaje de la actina (azul), Pd-Exos (blanco) y núcleos (amarillo).

**8. Exosomas derivados de
células madre como
transportadores de partículas
terapéuticas a tumores y zonas
multinodulares**

8. Exosomas derivados de células madre como transportadores de partículas terapéuticas a tumores y zonas multinodulares

8.1. Introducción

Las terapias basadas en hipertermia son una alternativa para el tratamiento de algunos cánceres. La hipertermia óptica se fundamenta en el uso de NPs capaces de absorber radiación en el NIR, tras ser irradiadas con un láser en este rango de longitudes de onda. Posteriormente, se produce un aumento de la temperatura local provocada por el calor transmitido por las NPs, conduciendo a la muerte de las células tumorales (por necrosis o apoptosis). En 2004, O'Neal y *co/s.*, lograron erradicar el crecimiento de tumores subcutáneos de células de carcinoma de colon, empleando NPs de sílice y oro recubiertas con PEG de 130 nm de diámetro, tras irradiarlos con un laser diodo.³⁷⁴

De entre todos los nanomateriales, las AuNPs exhiben propiedades físicas, ópticas, químicas y biológicas únicas; que junto con la posibilidad de ser sintetizadas en un gran variedad de formas y tamaños (nanoesferas, nanotubos, nanoprismas, nanoestrellas, etc.), las convierten en un material idóneo en el campo de la medicina. Además, estos nanomateriales son susceptibles de ser modificados con ligandos multifuncionales, aumentando su potencial en aplicaciones biomédicas. El oro presenta además baja toxicidad, alta biocompatibilidad.³¹⁰ Se han reportado estudios utilizando nanomateriales de oro como biosensores,³⁸⁶ vehículos liberadores de fármacos,³⁸⁷ vectores de hipertermia óptica,¹⁷² agentes de imagen y diagnóstico,³⁸⁸ o catalizadores bioortogonales.³⁸⁹

Como se ha mencionado anteriormente, una de las características mas atractivas de los materiales nanoestructurados, es que poseen propiedades diferentes a las del mismo material a escala macroscópica, debido a su pequeño tamaño y a su área superficial elevada. Estos nanomateriales, presentan propiedades ópticas particulares, y dependiendo de sus características morfológicas, pueden tener una banda de absorción característica en el rango del UV-VIS y del NIR del espectro electromagnético.³⁹⁰ Este máximo de absorbancia es debido al fenómeno de SPR, que ocurre cuando la luz interacciona con una de estas NPs y las ondas electromagnéticas son conducidas por el material debido a la oscilación colectiva de los electrones libres de valencia del metal (**figura 8.1**).³⁹¹ Esta oscilación produce un aumento en la absorción y en la dispersión de la radiación electromagnética en la zona del espectro

correspondiente a la frecuencia SPR de estas NPs. La frecuencia a la que ocurre dicho plasmón es característica del tamaño, la morfología y la composición química de las NPs, así como de las propiedades dieléctricas del medio en el que se encuentran. Cuando la frecuencia de la luz incidente coincide con la frecuencia de oscilación intrínseca del electrón, la partícula absorbe la luz incidente y se produce una conversión de la energía óptica a energía térmica en el medio que rodea las partículas.¹³⁰ El efecto SPR de las AuNPs ha sido empleado con diferentes fines, por ejemplo, para marcaje de célula viva³⁹², imagen^{393,394,395}, diagnóstico^{396,397,398} o terapia^{399,400}.

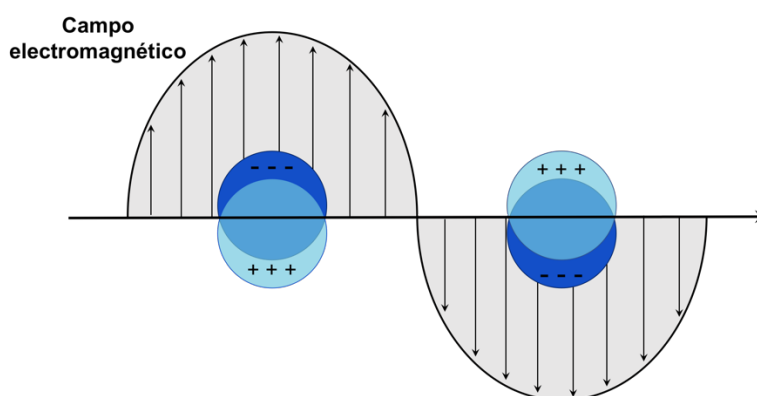


Figura 8.1. Ilustración del efecto SPR en una NP metálica esférica expuesta a un campo electromagnético.

En este trabajo se han sintetizado unas HGNs, capaces de absorber luz en el NIR en torno a 808 nm, para el tratamiento de cáncer por hipertermia óptica. Cuando dichas partículas son irradiadas empleando un haz de luz con su frecuencia SPR, absorben esta energía óptica y la disipan al medio de en forma de calor. Este aumento de temperatura, provoca la muerte de las células tumorales circundantes. En este caso, es crucial emplear un haz de luz con una frecuencia en el NIR dado que la penetración de la luz en los tejidos biológicos es mayor, debido a una absorbancia mínima del agua y de los cromóforos presentes en el organismo, principalmente melanina y hemoglobina (**figura 8.2**).⁴⁰¹

Como se ha comentado en la introducción de esta Tesis Doctoral, existen tanto métodos pasivos (basados en el efecto EPR), como estrategias activas (fundamentadas en la funcionalización de las partículas con polímeros, péptidos, aptámeros o anticuerpos) que reconocen selectivamente las zonas tumorales, acumulándose más exitosamente en el tejido canceroso comparado con las estrategias pasivas. Sin embargo, estos mecanismos no son aún suficientemente eficaces para dirigir las partículas selectivamente a los tumores, y en muchas ocasiones son reconocidas y eliminadas por los macrófagos. Además, aunque las partículas empleadas sean

capaces de transformar la luz NIR a calor, el uso de hipertermia de manera sistémica produce daños en tejidos no deseados, y, por tanto, es necesario desarrollar mecanismos selectivos y específicos para dirigir este tipo de terapias localmente a las áreas del organismo donde se encuentra el tumor.

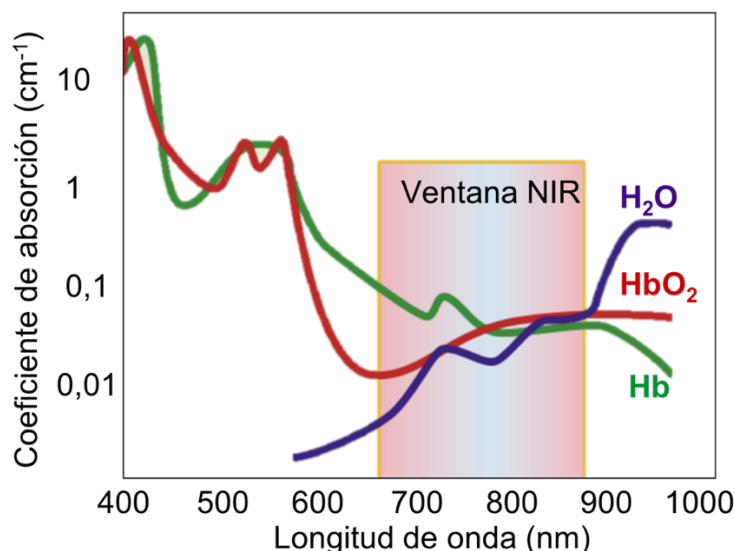


Figura 8.2. Ventana del NIR con una absorción de luz mínima de los componentes presentes en el organismo (hemoglobina, agua, etc.) entre 650 nm y 900 nm (adaptado de Weissleder y cols.⁴⁰¹).

Además de la funcionalización de las partículas con las entidades comentadas, algunos trabajos han propuesto el empleo de células propias del hospedador como vectores de las mismas, estrategia conocida como “caballo de Troya”. De entre todas las células propuestas para su empleo como “caballos de Troya” (células dendríticas, macrófagos o linfocitos),^{402,403,404} destacan las MSCs, las cuales migran hacia sitios de inflamación o de daño, como es el caso de los tumores o zonas metastásicas.^{405,406} Aunque no se sabe por completo el mecanismo que rige este fenómeno, es conocido que en el estroma del tumor se produce la liberación de citoquinas que interaccionan específicamente con moléculas presentes en la superficie de las MSCs. La liberación de estas citoquinas proinflamatorias (p.ej. $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ y $\text{IFN-}\gamma$) induce la expresión de proteínas de adhesión como integrinas y selectinas, favoreciendo la atracción de las MSCs. Las condiciones hipóxicas del tumor también inducen la secreción de factores de transcripción regulados por el factor inducible por hipoxia (HIF), que a su vez contribuye al reclutamiento de las MSCs a través de un aumento de la expresión de factores de crecimiento, citoquinas, quimiocinas y proteínas de adhesión.⁴⁰⁷ Entre los factores liberados en el microambiente tumoral destacan: EGF, VEGF-A, PDGF, FGF, GCSF, G-MCSF, HGF, $\text{TGF-}\beta 1$, CXCL7, CXCL6, CXCL5, CXCL8, CXCL12, CCL2, IL-6, así como el factor del plasminógeno tipo uroquinasa.⁴⁰⁶ Recientemente, en nuestro

grupo se inyectaron intratumoralmente e intravenosamente MSCs cargadas con HGNS y, tras irradiar las áreas neoplásicas con un láser NIR, se produjo una reducción en el tamaño de dichos tumores, observándose una mayor eficacia cuando las partículas estaban encapsuladas en las MSCs (comparado con las partículas libres).¹⁷² Sin embargo, el empleo de células como “caballos de Troya” tiene sus limitaciones, ya que se trata de entidades vivas que pueden modificarse por la presencia de las NPs, y que además pueden interaccionar con el organismo diana.⁴⁰⁸

Considerando las ventajas de las MSCs como “caballo de Troya”,⁴⁰⁹ y dado que los exosomas presentan las propiedades de las células de las que derivan, y a su vez, exhiben ventajas para ser usados como vectores (comparado con las células secretoras completas) estas vesículas se proponen como una excelente alternativa para vehiculizar terapias oncológicas *in vivo*.⁴¹⁰ Algunas ventajas generales del empleo de los exosomas como vectores terapéuticos comparado con sus células parentales son: menor inmunogenicidad, menor tamaño, mayor estabilidad, menor complejidad, mayor facilidad para ser modificados, se pueden purificar y producir a gran escala, fácil manipulación y menor coste. Igualmente, no plantean preocupaciones y cuestiones legales ni éticas comparado con el uso de células. Finalmente, se evita que pueda producirse la muerte de la propia célula, al ser administrada y facilita la administración local y el control del tratamiento.⁴¹¹

Según su célula de origen, destaca el empleo de exosomas derivados de MSCs como vehículos de terapias avanzadas para el tratamiento del cáncer. Dado que las propias células madre mesenquimales se comunican con los tumores y su microambiente, todo parece indicar que los exosomas que provienen de MSCs, son capaces de compartir las propiedades de las células de las que proceden y de poseer una marcada capacidad migratoria hacia los tumores, pudiendo usarse como vehículos transportadores de terapias a las neoplasias.

Algunas de las características de los exosomas derivados de MSCs son: la ausencia del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHCII) en sus membranas (por el contrario, sus células parentales sí lo presentan, lo que podría dar lugar a problemas de inmunogenicidad), así como la presencia de integrinas y moléculas de adhesión como CD29, CD44 o CD73 en su superficie, que se ha demostrado que son causantes directas del direccionamiento y de la acumulación y migración de estos exosomas en áreas de inflamación como tumores.^{412,413} Se ha visto que diferentes patrones de expresión de determinadas integrinas dirigen la migración de células tumorales a otros sitios secundarios para generar nichos premetastásicos, y además, dictan la adhesión de estos exosomas a ciertas células y a moléculas particulares de la ECM (p.ej.

exosomas que expresan ITG $\alpha_v\beta_5$ se unen específicamente a células de Kupffer mediando un direccionamiento hacia el hígado, mientras que exosomas que expresan las integrinas ITG $\alpha_6\beta_4$ y ITG $\alpha_6\beta_1$ se unen selectivamente a fibroblastos residentes y a células epiteliales presentes en los pulmones, determinando su tropismo hacia este órgano).⁴¹⁴ Así, Pascucci *y cols.*, emplearon exosomas derivados de MSCs para vehiculizar el quimioterapéutico PTX, observando una disminución en la viabilidad de células de adenocarcinoma de páncreas.⁴¹⁵ Por su parte, Munoz *y cols.*, utilizaron exosomas derivados de MSCs conteniendo un antimiR-9 en su interior para revertir la expresión de un transportador de fármacos en células de glioblastoma multiforme resistentes a quimioterapia, convirtiéndolas en células sensibles al tratamiento con temozolidina.⁴¹⁶

En esta memoria se han demostrado las propiedades excelentes que presentan los exosomas derivados de células madre de placenta (Exos^{hpMSCs}) y su utilización para vehiculizar las PEG-HGNs a células diana *in vitro*. Considerando los resultados de los capítulos previos, se eligió el método de incubación natural con las células parentales para encapsular las PEG-HGNs en los Exos^{hpMSCs}. También se ha demostrado la capacidad de direccionamiento de estos exosomas para dirigir la terapia únicamente a células diana, sirviendo como agentes selectivos y específicos de hipertermia óptica afectando únicamente a las células y los tejidos diana de interés. Considerando estos resultados previos, en este capítulo se propone la combinación de Exos^{hpMSCs} para vehiculizar y dirigir selectivamente PEG-HGNs a tumores xenograft y a zonas cancerosas intraperitoneales de ratones atímicos con el objetivo de maximizar su acumulación en estas zonas neoplásicas y ser tratadas por hipertermia óptica. Para ello se ha estudiado en primer lugar la biodistribución y posteriormente la eficacia terapéutica de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en dos modelos tumorales.

8.2. Experimental

8.2.1. Preparación de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} fluorescentes

Para realizar los experimentos de biodistribución y terapia *in vivo*, los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} se marcaron fluorescentemente con una sonda de marcaje de membrana (Claret, ex/em 655/675 nm) con el objetivo de poder visualizarlos en un equipo IVIS Lumina de manera no invasiva.

Previamente a la administración de los exosomas, se estudió la estabilidad del marcaje fluorescente de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en disolución durante 7 días. Para ello, los exosomas se purificaron por ultracentrifugación siguiendo el protocolo descrito en capítulos anteriores y se marcaron con la sonda Claret siguiendo las especificaciones

del fabricante. Para eliminar el exceso de sonda no unida a los exosomas, éstos se ultracentrifugaron durante 2 h a 100000 g. Los exosomas se resuspendieron en 1 mL de PBS y se incubaron durante 1, 2, 3 y 7 días a 37 °C. Pasados estos tiempos, los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} se ultracentrifugaron de nuevo y se midió la intensidad de fluorescencia con un lector Biotek en el precipitado de exosomas y en el sobrenadante. Dado que el lector no contaba con los filtros adecuados para medir la fluorescencia excitando a 655 nm y recogiendo a 675 nm, la presencia de la sonda Claret tuvo que detectarse midiendo su absorbancia a 630 nm.

8.2.2. Generalidades de los modelos animales y los procedimientos

Se ha empleado como especie animal el ratón de laboratorio (*mus musculus*). En concreto, se utilizaron ratones hembra de la estirpe Balb/c *nu/nu* de 6 a 8 semanas de edad (Envigo). Los animales se estabularon y mantuvieron en condiciones estériles en jaulas autoventiladas con ciclos de 12 h luz/oscuridad y con acceso a comida y agua *ad libitum*. Tras su llegada a las instalaciones CIBA, los ratones se mantuvieron en cuarentena y en aclimatación durante 7 días antes de comenzar con los experimentos. Ya que se trata de ratones atímicos, la manipulación de los mismos, así como la realización de los procedimientos se realizó siempre en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar.

Lo referente al manejo, instalaciones y eutanasia de los animales se realizó de acuerdo a la legislación vigente en materia de protección de animales utilizados para experimentación recogida en el RD 53/2013, englobado en la Directiva de la Unión Europea 2010/63 para la protección de animales usados en investigación o con otros fines científicos. Los procedimientos presentados en este estudio se realizaron bajo las Licencias PI28/19 (*Vehiculización de terapias avanzadas mediante el uso de exosomas. Estudio de la distribución y eficacia*) y PI04/19 (*Vehiculización de terapias avanzadas mediante el uso de células mesenquimales y sus derivados como vectores teragnósticos*) aprobadas por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal (CEA) de la Universidad de Zaragoza.

Los modelos tumorales empleados fueron:

- Modelo xenograft como modelo de tumor primario sólido. Para generar este tumor se implantaron subcutáneamente 3 millones de células HeLa (en 200 µL de PBS) en un flanco lateral del animal. La evolución del tamaño del tumor se monitorizó con un calibre cada 2/3 días hasta el final del experimento.
- Modelo de tumor multinodular en el peritoneo para asemejarse a un tumor diseminado con metástasis. En este caso, se inyectaron intraperitonealmente

800000 células SKOV3 infectadas establemente con un lentivirus que expresa el gen de la luciferasa (SKOV3_Luc), cedidas por el Dr. Antonio de la Vieja, del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). La presencia y evolución de los nódulos en la zona del páncreas se evaluó periódicamente midiendo la intensidad de bioluminiscencia emitida por las células cancerosas con el equipo IVIS Lumina. Para estas determinaciones se inyectaron 300 μ L de sustrato de luciferina intraperitonealmente antes de la adquisición de las imágenes. Posteriormente, los animales se anestesiaron con un 5 % de isoflurano/O₂ (inducción) y se mantuvieron al 2 % durante el tiempo de adquisición de las imágenes.

En todos los estudios, se administraron intravenosamente en la cola de los animales 100 μ g de PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} contenidos en 200 μ L de PBS. Antes de realizar la inyección se indujo la vasodilatación de la vena para facilitar su canulación, con una lámpara de infrarrojos.

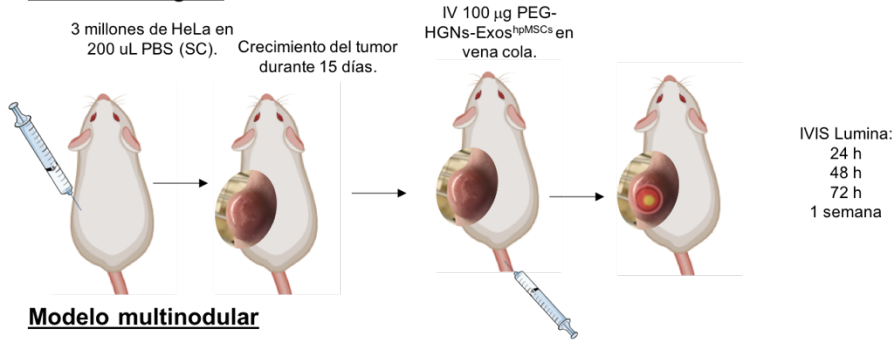
El sacrificio de los animales se realizó mediante eutanasia, por inhalación de CO₂ y a todos los tiempos de estudio se extrajeron el tumor, el hígado, el riñón, los pulmones, el bazo y el páncreas. En función del análisis *post mortem* realizado, los órganos se procesaron de manera diferente según lo indicado en las secciones posteriores.

8.2.3. Estudio de la biodistribución de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} *in vivo*

Con el fin de conocer la distribución de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en los diferentes tejidos antes de evaluar su potencial como vectores terapéuticos, estas vesículas extracelulares se inyectaron intravenosamente como se ha comentado anteriormente. Concretamente, 100 μ g de exosomas conteniendo 9,6 μ g de Au (en forma de PEG-HGNs) se administraron en animales con ambos modelos tumorales descritos (pasados 15 y 10 días de la implantación del tumor xenograft y de los nódulos cancerosos intraperitoneales, respectivamente). La inducción y el seguimiento de ambos tipos de tumores, se realizaron según lo indicado en el apartado anterior. La **figura 8.3** recoge un esquema mostrando todas las etapas del este estudio de biodistribución de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en ambos modelos tumorales.

8. Exosomas y nanopartículas. Hipertermia óptica *in vivo*

Modelo xenograft



Modelo multinodular

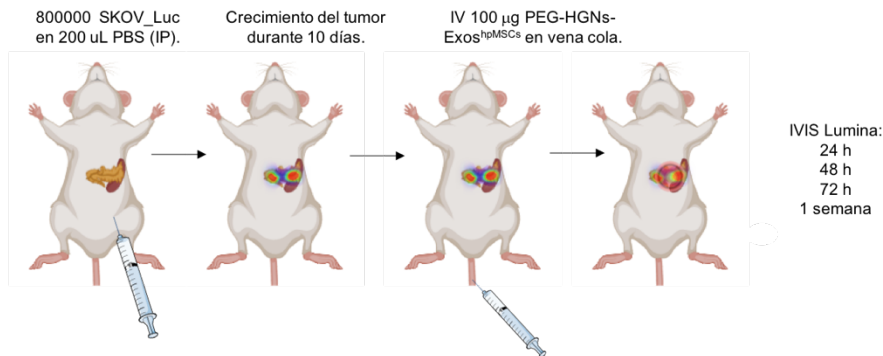


Figura 8.3. Esquema del estudio de biodistribución de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} realizado en ambos modelos tumores, desde la implantación de las células cancerosas hasta el sacrificio y análisis *post mortem* de los diferentes órganos extraídos.

Dentro de cada modelo, los animales se distribuyeron en dos grupos principales (grupo control sin tratamiento y grupo tratado con los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} fluorescentes). La intensidad de fluorescencia procedente de los exosomas en los tumores subcutáneos y en los nódulos tumorales peritoneales (según el modelo), se evaluó de manera no invasiva *in vivo* mediante el IVIS Lumina durante 7 días después de su administración intravenosa. Además, dentro del grupo que recibió tratamiento, se hicieron varios subgrupos en función del día de sacrificio (1, 2, 3 y 7 días después de la administración de los exosomas).

Pasados 1, 2, 3 y 7 días de la administración de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} fluorescentes, se sacrificaron los animales y los órganos comentados anteriormente se extrajeron para proceder a su análisis histopatológico. En concreto, los análisis *post mortem* del estudio de biodistribución de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} que se llevaron a cabo en ambos modelos se describen a continuación:

- **H&E:** los órganos se fijaron con PFA al 4 % durante 24 horas inmediatamente tras su extracción. Posteriormente, se transfirieron a una disolución de etanol frío al 70 %, tras lo cual, se embebieron en parafina. Se realizaron secciones de 3 µm de cada uno de los órganos de interés y se tiñeron mediante la técnica H&E.

8. Exosomas y nanopartículas. Hipertermia óptica *in vivo*

- Evaluación de la fluorescencia por microscopía confocal: para evaluar la fluorescencia de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en los diferentes órganos, estos fueron congelados en isopentano enfriado rápidamente con nitrógeno líquido tras su extracción. Posteriormente, los núcleos se tiñeron con DAPI (ex/em 358/461 nm) y las muestras se colocaron sobre un portaobjetos con medio de montaje Fluoromont-G antes de ser selladas. Finalmente se visualizaron sin usar ningún fijador con un microscopio confocal (Zeiss LSM 880) realizando multilineaciones de fotografías de 20 x en dirección zeta para visualizar el tejido completo e incluir el grosor de toda la lámina tisular. Dado que los exosomas se marcaron con la sonda Claret antes de ser administrados a los animales, estos se observaron directamente con un láser con una longitud de onda en el rojo lejano (ex/em 655/675 nm). En el caso del modelo de xenotrasplante se visualizó el tumor y en el caso del modelo multinodular intraperitoneal, se analizó el páncreas conteniendo los múltiples nódulos cancerosos.
- Análisis del contenido de oro en los diferentes órganos: los órganos se recogieron en fresco y se digirieron con agua regia (entre 1 y 6 mL dependiendo del volumen del órgano) durante 5 días. Posteriormente, se filtraron con un filtro de 0,22 µm y se diluyeron 100 veces en agua miliQ (1/100) para su análisis consecuente por ICP-MS (Perkin Elmer Elan DRC-e). La cuantificación de oro en los órganos se realizó al tiempo de acumulación máximo de PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en los tumores, determinado previamente por IVIS y por microscopía confocal. Igualmente, en un grupo de ratones se administraron las partículas de forma libre (PEG-HGNs) y el contenido de Au presente en los órganos se analizó por ICP-MS como en el caso de los animales tratados con los exosomas. Para normalizar la cantidad de Au inyectada en forma de PEG-HGNs o de PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs}, se administraron de forma libre en la vena de la cola de los ratones 19,2 µg de PEG-HGNs (esta cantidad se estableció haciendo un análisis de MP-AES de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} para averiguar la cantidad de Au contenida en ellos. Además, se consideró que el 50 % de la masa de las PEG-HGNs se correspondía con Au (obtenido a partir de estudios previos de TGA).

8.2.4. Evaluación de PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} como vectores de hipertermia óptica *in vivo*

Para evaluar el potencial de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} como vectores de hipertermia óptica en ambos modelos animales, en primer lugar, se indujeron los

tumores xenograft subcutáneos y los nódulos cancerosos en el peritoneo. Pasados 15 y 10 días (tiempo en el que los tumores habían alcanzado el tamaño idóneo para comenzar con el tratamiento) se procedió a la administración intravenosa de los 100 μg de PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en los animales con modelo de xenotrasplante y con el modelo multinodular, respectivamente. Dentro de cada modelo tumoral los animales se dividieron en cuatro grupos de cinco animales cada uno tal y como indica la **tabla 8.1**.

Tabla 8.1. Resumen de los grupos experimentales.

Modelo xenograft	Modelo multinodular
Control 1) sin PEG-HGNs-Exos ^{hpMSCs} y sin laser	Control 1) sin PEG-HGNs-Exos ^{hpMSCs} y sin laser
Control 2) con PEG-HGNs-Exos ^{hpMSCs} y sin laser	Control 2) con PEG-HGNs-Exos ^{hpMSCs} y sin laser
Control 3), sin PEG-HGNs-Exos ^{hpMSCs} y con laser	Control 3), sin PEG-HGNs-Exos ^{hpMSCs} y con laser
Con PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} y con láser	Con PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} y con láser

Con el experimento de biodistribución previamente detallado en el apartado anterior, se determinó el tiempo máximo de acumulación de los vectores en ambos tipos de tumores en cada uno de los modelos estudiados. Concretamente, se establecieron 48 y 72 horas tras de la administración intravenosa de los exosomas, como los tiempos de acumulación óptima de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en ambos tipos de tumores y, en consecuencia, para ser irradiados con el láser NIR. Las condiciones de irradiación se optimizaron para cada uno de los modelos tal y como se describe en la **tabla 8.2**. Es importante mencionar que en el caso del modelo de xenotrasplante se empleó un colimador para irradiar el tumor externamente. Por lo contrario, los nódulos en el páncreas se irradiaron intraperitonealmente con una sonda cilíndrica radial.

Tabla 8.2. Características de la irradiación en ambos modelos tumorales.

Característica	Modelo xenograft	Modelo multinodular
Laser	NIR (808 nm)	NIR (808 nm)
Tiempo de irradiación	5 minutos	5 minutos
Potencia de irradiación	2,2 W	1,5 W
Modo de irradiación	Externamente	Intraperitonealmente con microcirugía
Tipo de sonda	Sonda con colimador	Sonda con irradiación 360°

La **figura 8.4** muestra un esquema de ambos tipos de fibras láser empleadas. En el caso del modelo xenograft se empleó un colimador cilíndrico de 300 μm para obtener un “haz” homogéneo, paralelo y concentrado en el área de interés. Por su parte, en el caso del modelo multinodular, se utilizó una fibra diseñada para realizar terapias

fotodinámicas intraluminales. Se trata de un difusor cilíndrico muy flexible y delgado (0,98 mm) que produce una patrón de irradiación homogéneo radial (Medlight S.A.), de esta manera se garantizó que la energía óptica del láser llegara exitosamente a todas las áreas cancerosas de interés.

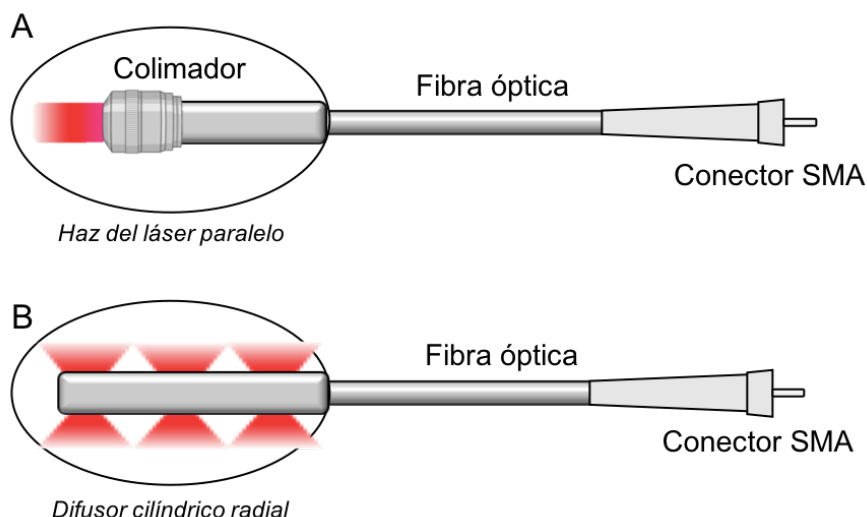


Figura 8.4. A) Fibra óptica conectada a colimador empleada para irradiar el tumor en el modelo de xenotrasplante. B) Fibra óptica con un difusor cilíndrico con emisión radial empleado para irradiar las áreas cancerosas en el páncreas del modelo multinodular intraperitoneal.

En **anexo 5** recoge el montaje experimental empleado para realizar el tratamiento láser NIR de los tumores de los animales de ambos modelos. Las irradiaciones se realizaron bajo anestesia inhalatoria en una cabina de flujo laminar conteniendo una mezcla del 5 % de isoflurano/O₂ (inducción), y los animales se mantuvieron con un 2 % de la mezcla durante la irradiación. Dado que se trata de animales atímicos, éstos se colocaron siempre sobre una manta eléctrica para controlar su temperatura corporal. Igualmente, se les aplicó Lubrital para evitar la sequedad en los ojos durante el tiempo que estuvieron anestesiados.

En el caso del modelo multinodular, con el objetivo de garantizar una elevación de temperatura de los órganos conteniendo los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} (sin dañar tejidos sanos) y para garantizar que la elevación de la temperatura se producía exclusivamente por la presencia de las partículas fototerapéuticas excitadas con el láser NIR, se optimizó tanto el tiempo como la potencia de la fibra del láser con un estudio piloto *ex vivo* antes de proceder con el experimento de hipertermia *in vivo*. Para ello, el hígado, bazo y páncreas de animales de desecho se irradiaron con el láser a tres potencias diferentes: 1,5; 2 y 2,5 W y se registró el cambio de temperatura durante 5 minutos. En ambos modelos, el cambio de temperatura superficial durante la irradiación se monitorizó con un termopar. En el caso de los modelo de xenotrasplante, durante las 72

horas posteriores a la irradiación se les aplicó ALOEVET para favorecer la cicatrización de la quemadura provocada por el aumento de temperatura. Por su parte, en el caso de los ratones con el modelo multinodular, se les realizó una incisión en la piel y el peritoneo a la altura del páncreas por la cual se introdujo la sonda del láser para irradiar los nódulos intraperitonealmente. Posteriormente, se aplicó uno o dos puntos de sutura (en función de la necesidad) y se les administró subcutáneamente buprenorfina tras la irradiación. Una semana después de la primera administración intravenosa y su correspondiente irradiación, se llevó a cabo una segunda administración de 100 µg de PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} y una segunda irradiación con el láser, en las mismas condiciones que la primera aplicación.

La evolución del tamaño de los tumores (y del número de nódulos cancerosos en el caso del modelo multinodular) en ambos modelos se evaluó durante aproximadamente un mes, tal y como se ha comentado anteriormente (en el caso del modelo de xenotrasplante con ayuda de un calibre y en el caso del modelo multinodular por la intensidad bioluminiscencia emitida por las células cancerosas utilizando IVIS). El estudio se finalizó cuando el tamaño tumoral de los animales control (no tratados) alcanzó el tamaño máximo permitido por la legislación (o bien cuando el número de nódulos en el modelo multinodular fue superior a 5). En este momento, los animales se eutanasiaron con CO₂. El tumor o nódulos cancerosos (dependiendo del modelo), el páncreas, los riñones, el hígado, los pulmones, el bazo, los pulmones y la piel de la zona irradiada se aislaron para su posterior análisis histopatológico en ambos modelos tumorales. Los análisis histopatológicos realizados para evaluar la eficacia del tratamiento antitumoral de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} combinados con el laser NIR fueron los siguientes:

- H&E: tal y como se ha descrito previamente.
- Inmunohistoquímica de la proteína Ki-67: para evaluar el índice de proliferación de las células tumorales se realizó una tinción inmunohistoquímica de la proteína Ki-67, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-humano (Agilent). Las secciones se incubaron a temperatura ambiente y pH=7 durante 20 minutos con el anticuerpo primario. Para la visualización del marcaje se empleó el sistema Flex/HRP Envision de Agilent, junto con una tinción de contraste con hematoxilina. El nivel de expresión de Ki-67 se evaluó en todos los grupos con ayuda del software ImageJ cuantificando las células positivas y las células negativas en diez campos de visión de imágenes adquiridas en contraste de fases en un

microscopio invertido. Los resultados se expresan como porcentaje de células positivas para la proteína Ki-67.

La **figura 8.5** recoge un esquema del estudio completo realizado para evaluar las propiedades terapéuticas de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} como vehículos de hipertermia óptica.

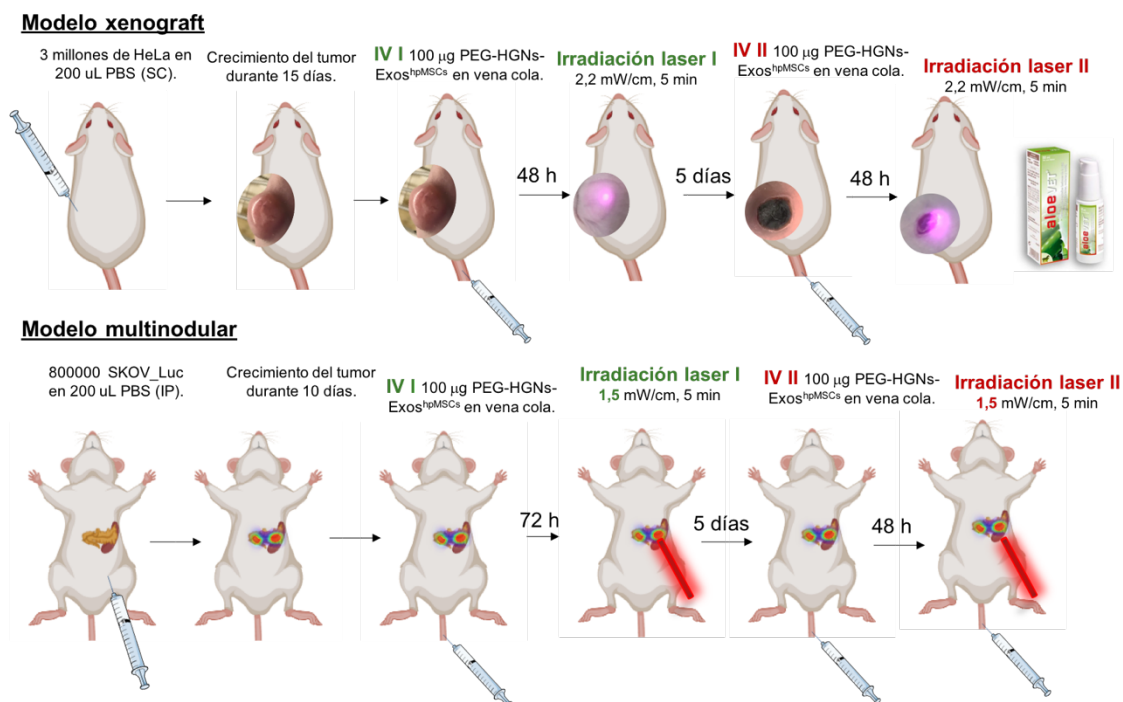


Figura 8.5. Esquema del estudio completo realizado para evaluar las propiedades terapéuticas de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} como vehículos de hipertermia óptica llevado a cabo en ambos modelos tumorales.

8.3. Resultados y discusión

8.3.1. Caracterización PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} fluorescentes

Para poder evaluar la localización *in vivo* de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} y su biodistribución en ambos modelos tumorales, éstos fueron marcados fluorescentemente, inmediatamente después de haber sido aislados de los cultivos celulares y antes de su administración intravenosa. Para ello, se empleó una sonda de membrana (Claret ex/em 655/675 nm) y se evaluó su estabilidad y durabilidad en los exosomas a lo largo de 7 días. Una vez marcados y puestos en 1 mL de PBS durante 24, 48, 72 h y 1 semana a 37 °C, por un lado, los exosomas se ultracentrifugaron para descartar la posible sonda liberada al medio y, por otra parte, la sonda fluorescente fue también medida directamente en la solución exosomal sin separar el precipitado del sobrenadante. Como se observa en la **figura 8.6**, la sonda Claret detectada en el precipitado de PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} sumada a la del sobrenadante, se correspondía

con el total de la sonda en la solución sin separar ambas fracciones (control). Estos resultados demuestran como la sonda se mantuvo establemente anclada a la membrana de los exosomas sin liberarse al sobrenadante conforme aumentó el tiempo de incubación.

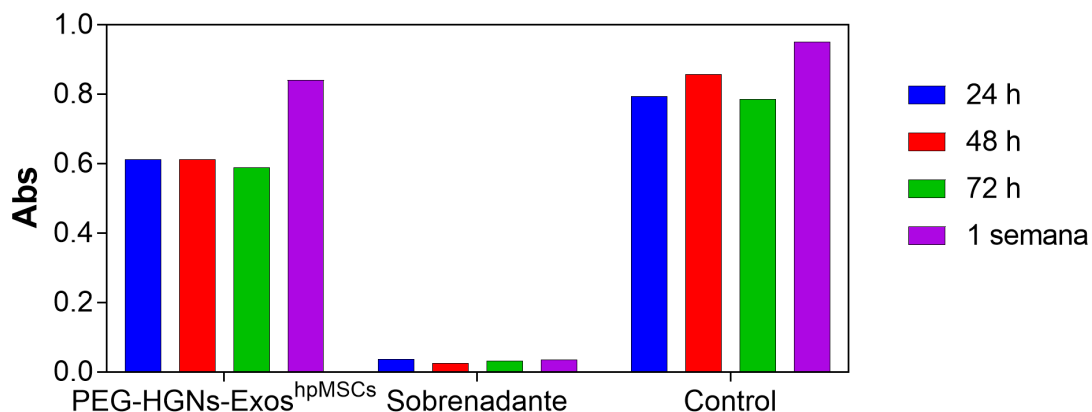


Figura 8.6. Estabilidad del marcaje de los exosomas con la sonda fluorescente Claret durante 1 semana. No se observó liberación de la sonda fluorescente al sobrenadante.

8.3.2. Caracterización de los modelos tumorales

Como se ha comentado a lo largo de esta memoria, las MSCs tienen capacidad de migrar a sitios de daño e inflamación,⁴⁰⁵ y dado que los exosomas presentan las características intrínsecas de las células de las que derivan, se analizó la capacidad de estas vesículas extracelulares para acumular las NPs terapéuticas en tejidos dañados e hipóxicos, como son los tumores. En concreto, se ha trabajado con 1) un modelo xenotrasplante de tumor primario de células HeLa que se caracteriza por una gran agresividad y un rápido crecimiento y; 2) un modelo multinodular intraperitoneal con diversos nódulos en la zona del páncreas tras la implantación de células SKOV3 infectadas con un lentivirus que expresa el gen de la luciferasa, para simular un modelo metastásico, lo que supone un reto todavía mayor frente al uso de un tumor primario.

Los estudios histopatológicos de H&E permitieron caracterizar ambos modelos tumorales. Los animales con el xenotrasplante presentaban un tumor subcutáneo con una zona expansiva no encapsulada con una alta proliferación de células neoplásicas, compuesta por una extensa capa de células pleomórficas con forma poliédrica y mitosis atípicas (**figura 8.7.A**). Las células tumorales mostraron un núcleo con forma redondeada u ovoide, un nucléolo prominente y zonas con citoplasma eosinofílico mal definido. En estos tumores, el estroma estaba mal definido. Por su parte, en el modelo multinodular intraperitoneal se observó la aparición de masas tumorales visualizadas microscópicamente como zonas con una alta proliferación de células neoplásicas, de

localización peripancreática o bien en el interior del parénquima pancreático (**figura 8.7.B**). Del mismo modo que en el caso del tumor xenograft, las células tumorales SKOV3 presentaban un núcleo con forma redondeada u ovoide y un citoplasma eosinofílico escasamente definido. En algunos casos, también se observaron tumores cercanos al hígado o bazo, aunque un número significativamente menor. En la **figura 8.7.C** se recoge una fotografía de IVIS de un animal con un xenotrasplante y en la **figura 8.7.D** una adquisición de bioluminiscencia en un ratón con el modelo multinodular, donde puede claramente observarse los nódulos en la zona del páncreas y bazo.

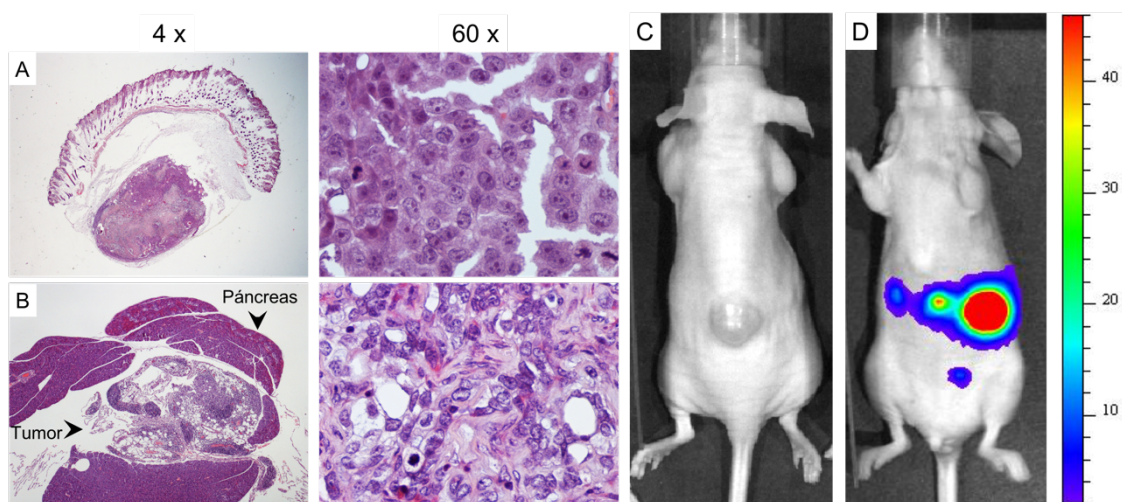


Figura 8.7. Fotografías a diferentes aumentos de una tinción con H&E de tejidos incluidos en parafina A) Xenotrasplante de células tumorales subcutáneas. B) Tejido pancreático en el cual puede observarse el tumor y el páncreas rodeándolo. C) y D) imágenes de IVIS de un ratón con un xenotrasplante y de otro animal con múltiples nódulos en la zona del páncreas implantados intraperitonealmente.

8.3.3. Biodistribución de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en el modelo de xenotrasplante

Tras caracterizar ambos modelos tumorales, se procedió al estudio de biodistribución de los exosomas. En primer lugar, se va a describir el análisis de la biodistribución de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en los animales del modelo más sencillo (xenotrasplante). La **figura 8.8.A** recoge imágenes de fluorescencia de IVIS de los tumores *ex vivo* tras 24, 48, 72 h y 1 semana de la administración de los exosomas en la vena de la cola del ratón, observándose una señal de fluorescencia máxima a las 48 horas de su inyección.

A partir de las imágenes obtenidas en el IVIS de todos los ratones de cada grupo, se cuantificó esta intensidad de fluorescencia en los diferentes órganos para realizar un análisis semicuantitativo y tener una idea de la acumulación de los exosomas a cada tiempo de estudio. La **figura 8.8.B** recoge la biodistribución de los exosomas en el

tumor, hígado, riñones, bazo, páncreas y pulmones de ratones control (sin tratamiento) y de ratones tratados con PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} pasadas 24, 48, 72 h y 1 semana de su administración intravenosa. El análisis estadístico de estos resultados se realizó en cada órgano por separado, comparando el nivel de fluorescencia de los órganos de los animales tratados con los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} con el nivel de fluorescencia de órganos de animales control (sin tratamiento). En este punto, es importante remarcar que todos los órganos presentaron una autofluorescencia base. La **figura 8.8.B** indica que en el páncreas y en los riñones no se observó acumulación de los exosomas a ninguno de los tiempos de estudio.

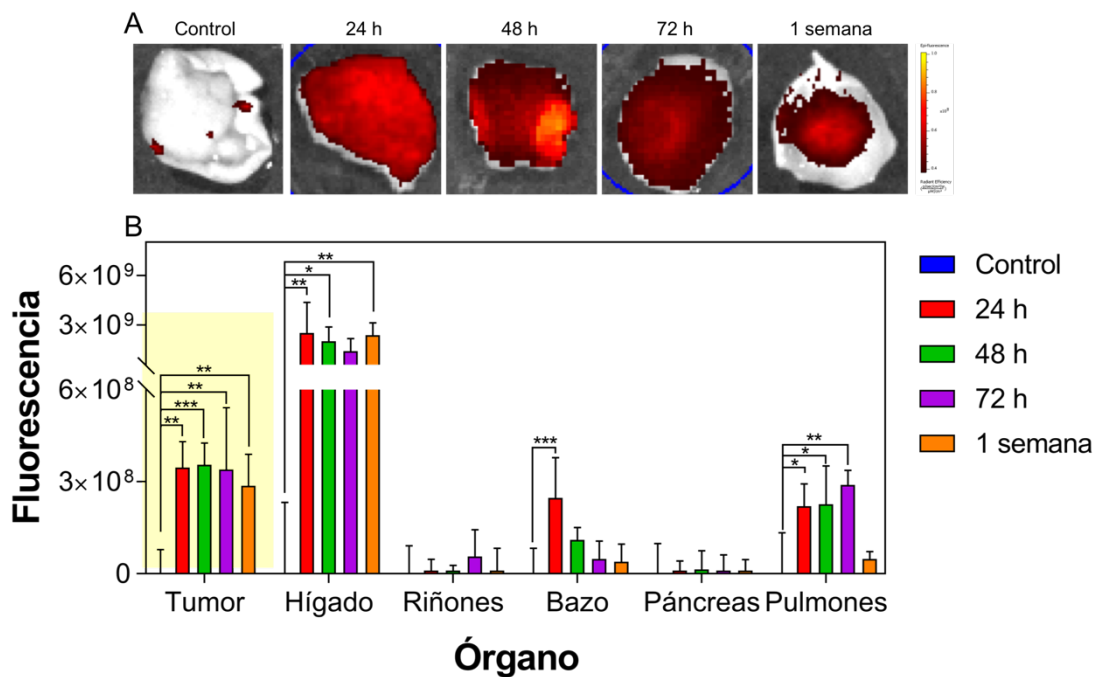


Figura 8.8. A) Visualización de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en los tumores xenograft extraídos de animales tras 24, 48, 72 h y 1 semana de su administración intravenosa. B) Biodistribución *in vivo* de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en ratones con un modelo de xenotrasplante.

La ausencia de fluorescencia en los riñones demuestra que estas vesículas no se estaban eliminando vía renal, por la orina. Por su parte, en los pulmones, se observó una acumulación de exosomas creciente durante las primeras 72 horas, si bien, pasada 1 semana no se detectaron vesículas en este órgano. Algunos estudios han descrito la acumulación de vesículas extracelulares derivadas de células madre en los pulmones tras 5 o 24 horas de su administración.^{417,418} Además también se ha demostrado que las MSCs se distribuyen inicialmente en los pulmones, aunque pasados 3 días de su administración tienden a diseminarse por el resto de órganos del animal.⁴¹⁹ Por tanto, dado que los exosomas preservan las entidades biológicas y moleculares de las células de las que derivan, nuestros resultados están en concordancia con la bibliografía,

observando una acumulación inicial de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en los pulmones durante los tres primeros días de su administración intravenosa y una desaparición a partir de dicho tiempo. En el hígado también se observó una acumulación significativa de PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs}. Trabajos previos ya han demostrado que las vesículas extracelulares marcadas con sondas fluorescentes y, administradas intravenosamente, tienden a acumularse mayoritariamente en el hígado.⁴²⁰ En el caso del tumor, se observó una llegada de los exosomas fluorescentes durante todos los tiempos de estudio, si bien, pasadas 48 horas de su administración, la cantidad de PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} acumulados en el tumor fue máxima.

El análisis de inmunofluorescencia *post mortem* realizado en los tumores demostró de nuevo que, tras 48 horas de la administración intravenosa de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs}, la bioacumulación de estas vesículas en los tumores fue máxima (figura 8.9).

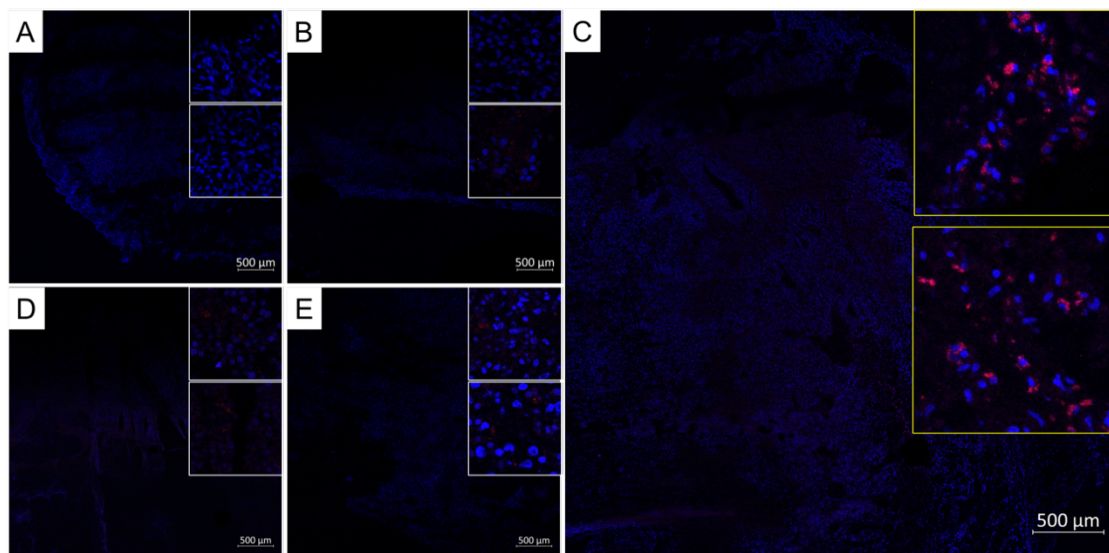


Figura 8.9. Imágenes de multialineamiento de fotografías adquiridas en un microscopio confocal LSM 880 con el objetivo de 20 x de tumores xenograft extraídos de ratones control (A) o de ratones tratados con PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} intravenosamente tras 1 (B), 2(C), 3(D) y 7 (E) días de su administración.

En las imágenes de microscopía confocal puede observarse el tejido tumoral gracias al marcaje de los núcleos de las células cancerosas con DAPI, así como la acumulación de los exosomas fluorescentes en el citoplasma de dichas células (observados como agregados rojos). Durante las primeras 24 h se observó una pequeña acumulación de estos exosomas, la cual aumentó significativamente a las 48 h alcanzando un valor máximo. Pese a que se pudo observar una pequeña cantidad de PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en los tumores tras 72 h y 1 semana, ésta fue significativamente

menor comparada con las 48 horas. Estos resultados estaban en concordancia con los datos de biodistribución *in vivo* obtenidos por el IVIS mostrados en la **figura 8.8**.

La cuantificación del contenido de oro en el grupo de animales sacrificados tras 48 horas de la administración intravenosa de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} realizada por ICP-MS demostró que a pesar de que la mayor parte de las partículas se acumulaban en el hígado, el 1,5 % del oro inicial inyectado en la vena de la cola, se localizaba en el tumor (**figura 8.10**). En general, la mayor parte del Au se localizó en el hígado ($89,7 \pm 1,9$ %), seguido del bazo ($4,5 \pm 0,8$ %), los pulmones ($3,4 \pm 1,8$ %), el tumor ($1,5 \pm 0,08$ %), los riñones ($0,8 \pm 0,07$ %) y por último el páncreas ($0,6 \pm 0,1$ %). Por su parte, al evaluar la cantidad de oro presente en estos órganos cuando las PEG-HGNs eran administradas de forma libre (en lugar de encapsuladas en exosomas), los porcentajes de acumulación fueron: hígado ($91,4 \pm 0,3$ %), bazo ($7 \pm 4,3$ %), riñones ($1,1 \pm 0,62$ %), pulmones ($1 \pm 0,8$ %), páncreas ($1 \pm 0,4$ %) y, por último, tumor ($0,4 \pm 0,2$ %). Estos resultados demuestran como la encapsulación de las partículas en el interior de exosomas derivados de células madre mesenquimales favoreció su direccionamiento y su tropismo hacia los tumores, logrando aumentar la cantidad de partículas acumuladas hasta un 1,5 %. Además, cuando las partículas fueron encapsuladas en los exosomas, el tumor fue el cuarto órgano donde se observó mayor cantidad de oro. Por lo contrario, cuando éstas fueron administradas de forma libre, el tumor fue el órgano donde menor cantidad de oro se detectó (un 0,4 % de la cantidad inicial administrada).

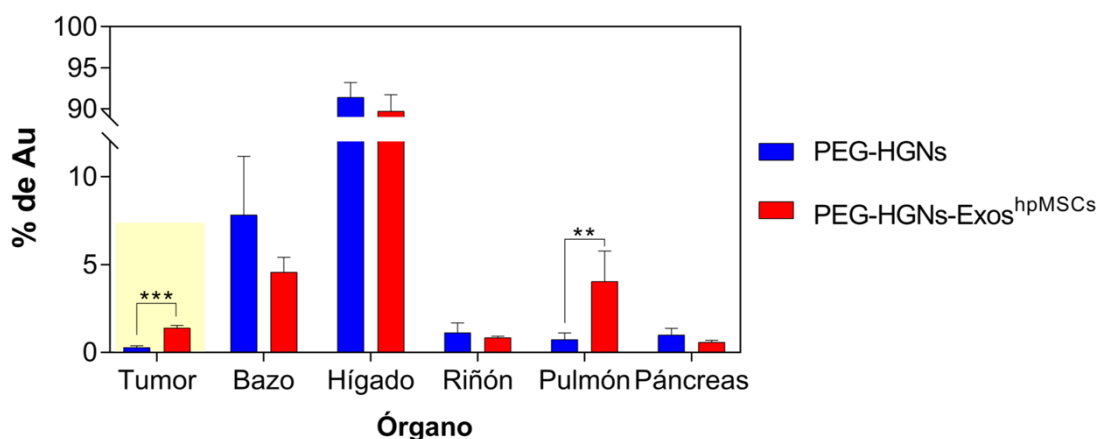


Figura 8.10. Resultados de ICP-MS cuantificando la cantidad de oro para evaluar la biodistribución de las PEG-HGNs administradas de forma libre o encapsuladas en los exosomas (PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs}), en un modelo de xenotrasplante tras 48 horas de su administración intravenosa en la cola de los animales.

Es importante remarcar que, parte de la inespecificidad y de la migración de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} al hígado puede deberse a la rigidez de estas vesículas aportada

por las partículas, lo que favorecería su paso hacia el hígado. Además, a pesar de que se mantuvo la integridad y la funcionalidad de los exosomas, únicamente el 50 % de las partículas estaban encapsuladas en los mismos (ver capítulo 4). Por tanto, es posible que parte de este contenido de oro provenga de la población de partículas desnudas que no pudieron encapsularse en los exosomas careciendo de las propiedades de direccionamiento aportadas por los mismos.

El análisis histopatológico no reveló alteraciones microscópicas visibles asociadas a la acumulación de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en ninguno de los tejidos estudiados. La **figura 8.11** recoge imágenes representativas del análisis histopatológico mediante tinciones rutinarias de H&E de diferentes órganos, tras 48 horas y 1 semana de la administración de los exosomas.

Su análisis indicó la ausencia de efectos adversos evidentes, tales como zonas de degeneración, o necrosis, ni siquiera indicaciones de hepatotoxicidad mínima (vacuolización), asociables a la acumulación intracelular de los vectores. El hígado de los ratones control, así como de los ratones tratados con los exosomas, presentaron una arquitectura normal con hepatocitos ordenados. En el caso del bazo, se observó igualmente una organización tisular normal de pulpa roja y de pulpa blanca. El páncreas mostró los islotes de Langerhans bien definidos rodeados por una porción exocrina de tejido pancreático. En el caso del pulmón, todos los animales presentaron una estructura característica del tejido pulmonar compuesto principalmente por tejido alveolar, con espacios alveolares normales y septos alveolares. El parénquima renal de los animales control y los tratados con exosomas también mostró una estructura histológica normal, incluyendo los glomérulos renales rodeados de tejido conjuntivo, así como los túbulos contorneados proximales distales.

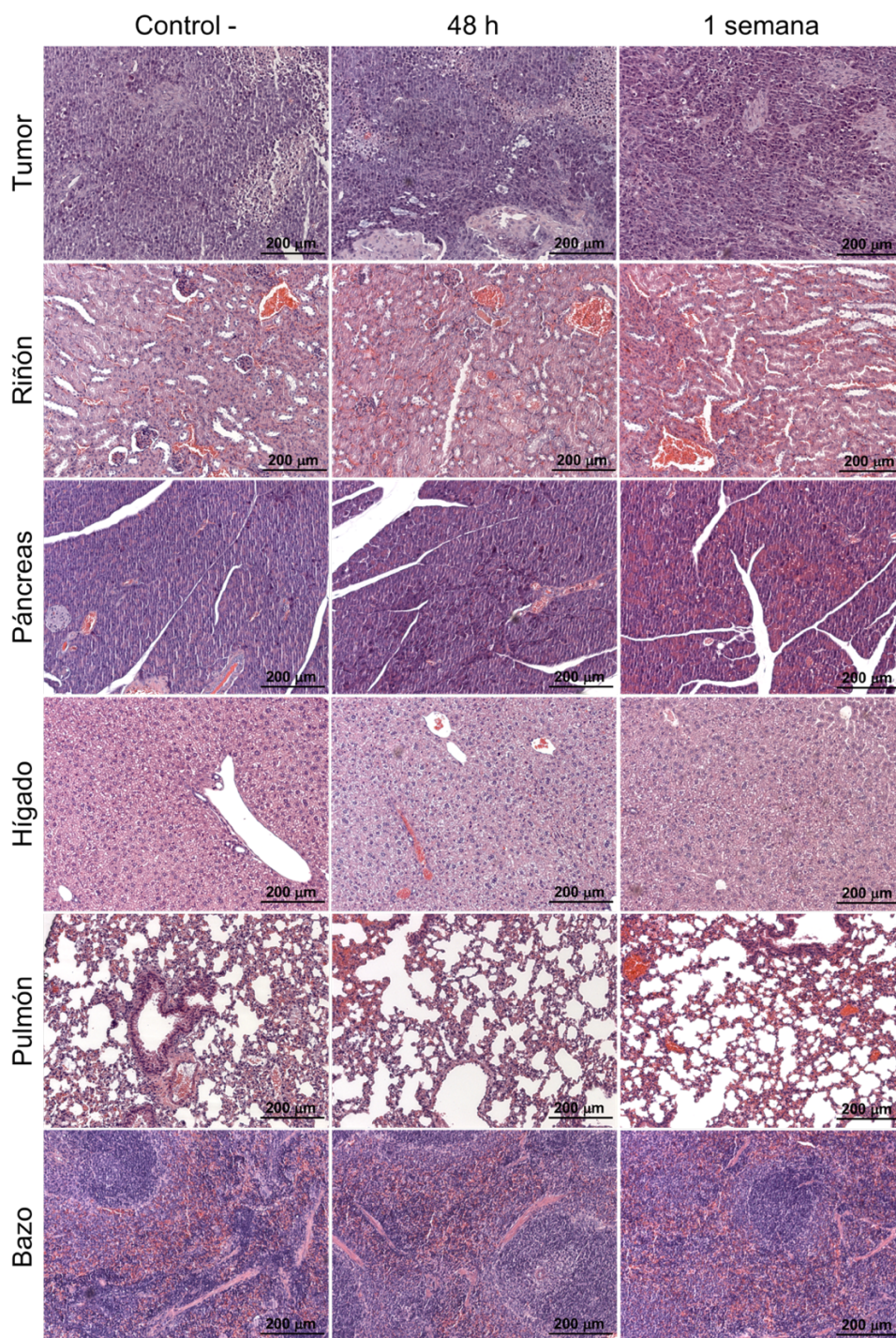


Figura 8.11. Resultados de la tinción de H&E de secciones recogidas pasadas 48 horas y 1 semana de la administración de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} (en los animales con el modelo de xenotrasplante) de los órganos estudiados (tumor, riñón, páncreas, hígado, pulmón y bazo).

8.3.4. Biodistribución de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en un modelo tumoral multinodular

Al igual que en el modelo de xenotrasplante, antes de realizar los experimentos de terapia mediada por hipertermia óptica en un modelo multinodular asemejando un

tumor metastásico (un reto todavía mayor comparado con el modelo de tumor primario xenograft), se evaluó la biodistribución de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en este modelo. Como ya se ha comentado, en este modelo tumoral dio lugar la aparición de múltiples regiones cancerosas en el páncreas y su entorno, si bien en algunos animales también se observaron áreas cancerosas minoritarias en el hígado y en el bazo. La **figura 8.12.A** y la **figura 8.12.B** muestran adquisiciones de bioluminiscencia (para ver los nódulos tumorales) y de fluorescencia (para ver los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs}), del páncreas de ratones control y de animales sacrificados tras 48, 72 h y 1 semana de la administración de los vectores en la vena de la cola de los ratones.

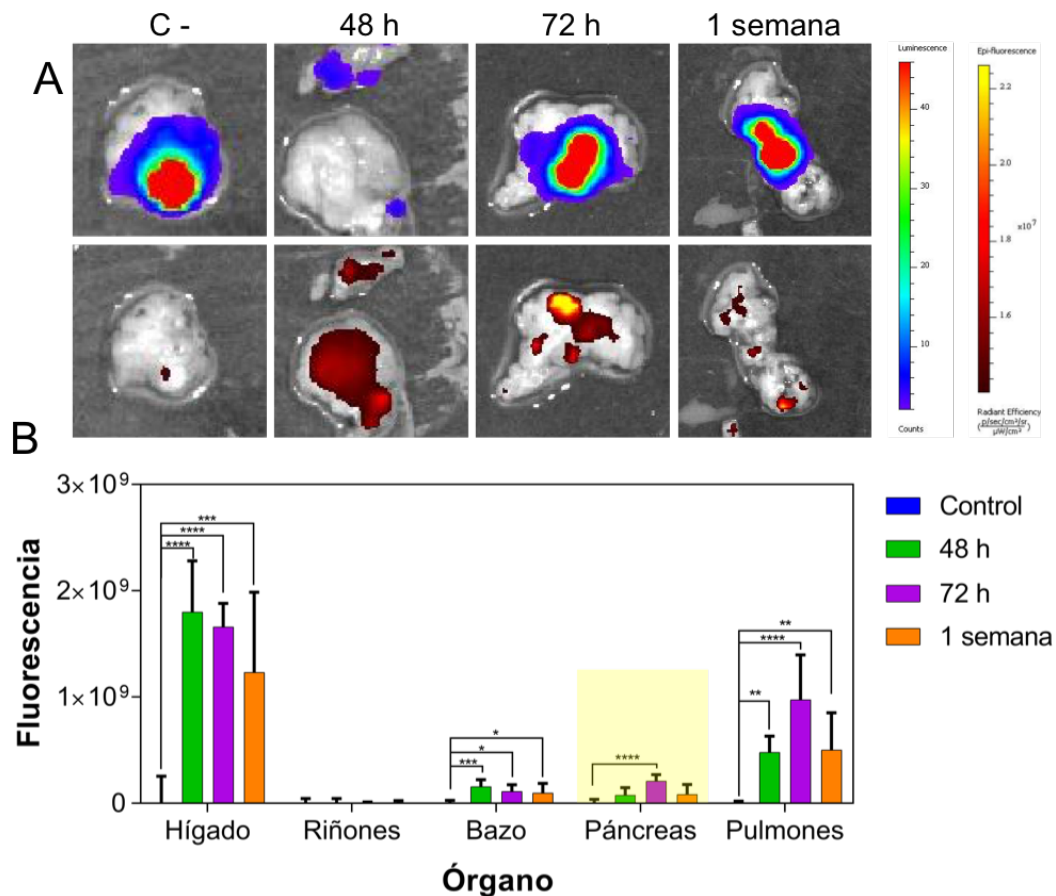


Figura 8.12. A) Visualización de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en los páncreas invadidos por múltiples nódulos cancerosos, extraídos de animales tras 48, 72 h y 1 semana de su administración intravenosa. B) Biodistribución *in vivo* de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en ratones con el modelo multinodular implantado.

Realizando un análisis semicuantitativo de la intensidad de fluorescencia detectada en todos los órganos de estos animales, pudo estimarse la biodistribución de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en animales conteniendo múltiples nódulos cancerosos en el peritoneo. Al igual que en el caso del xenotrasplante, la **figura 8.12.B** demostró una acumulación mayoritaria de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} tanto en el hígado como en los

pulmones a todos los tiempos de estudio. De nuevo, la acumulación de estos exosomas en los pulmones fue máxima pasadas 72 horas de su administración intravenosa y posteriormente disminuyó. Por su parte, en el páncreas (conteniendo la mayoría de nódulos tumorales) pudo observarse una acumulación máxima de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} tras 72 horas de su administración (estadísticamente significativa). En este punto, cabe destacar que en la **figura 8.12.B**, no se observó señal fluorescente en el páncreas a ninguno de los tiempos de estudio, demostrándose el direccionamiento y la selectividad en la migración de los exosomas al páncreas únicamente cuando éste contenía tumores. Además, en el bazo (debido a su proximidad) también se produjo una acumulación de los exosomas, ya que éste presentaba también áreas tumorales, principalmente en la zona de unión al páncreas, demostrando de nuevo el tropismo preferencial de los exosomas por las áreas de inflamación (en este caso de zonas cancerosas) incluso cuando se trataba de múltiples áreas cancerosas (simulando una metástasis) y no únicamente de tumores primarios.

El análisis de inmunofluorescencia por microscopía confocal *post mortem* realizado en el tejido pancreático de los animales con los múltiples nódulos implantados, reveló de nuevo que la acumulación máxima de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} pasadas 72 horas de su administración (**figura 8.13**).

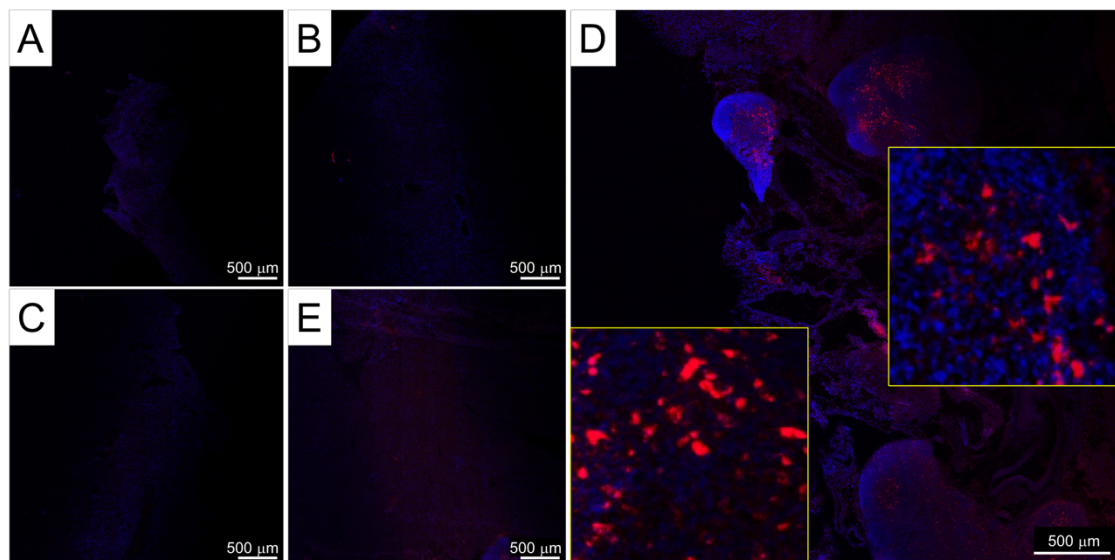


Figura 8.13. Imágenes de multialineamiento de fotografías adquiridas en un microscopio confocal LSM 880 con el objetivo de 20 x del páncreas conteniendo múltiples nódulos tumorales extraídos de ratones control (A) o de ratones tratados con PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} intravenosamente tras 1 (B) 2(C), 3(D) y 7 (E) días de su administración.

Estos resultados corroboran los mostrados en la **figura 8.12**, donde se determinó una cantidad máxima de exosomas fluorescentes en las regiones tumorales a este tiempo. De nuevo, la fluorescencia roja proveniente de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} se

observó en el rojo lejano en el citoplasma de las células (en las fotografías se observaron los núcleos de las células de color azul, marcados en DAPI). A las primeras 24 y 48 horas, no se observó acumulación de los exosomas en los nódulos cancerosos, si bien a las 72 horas claramente se visualizó la señal roja en los tejidos pancreáticos. Pasada una semana, todavía había una cantidad de PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} susceptible de ser detectada, si bien, la cantidad fue significativamente menor comparada con las 72 horas.

El análisis del contenido de oro por ICP-MS en el grupo de animales sacrificados tras 72 horas de la administración en la vena de la cola de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs}, demostró que a pesar de que gran parte de las partículas se acumulaban en el hígado, el 1,5 % del oro inicial administrado intravenosamente, se localizaba en el páncreas conteniendo los nódulos cancerosos (**figura 8.14**). En general, la mayor parte del Au se localizó en el hígado ($90 \pm 2,1$ %), seguido del bazo ($3,4 \pm 1,2$ %), los pulmones ($3,2 \pm 0,7$ %), el páncreas con los tumores ($1,5 \pm 0,2$ %) y los riñones ($0,98 \pm 0,7$ %). Estos porcentajes de biodistribución los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} a partir del análisis de la cantidad de Au presente en cada uno de los órganos, mostraron un perfil similar al obtenido en los animales con un tumor primario xenograft. De hecho, el 1,5 % de los exosomas administrados inicialmente se localizaron en el páncreas con los nódulos cancerosos, pasadas 72 h de la administración. En el caso del modelo de xenotrasplante, también el 1,5 % de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} administrados de la misma manera se localizaron en el tumor tras 48 h de su administración.

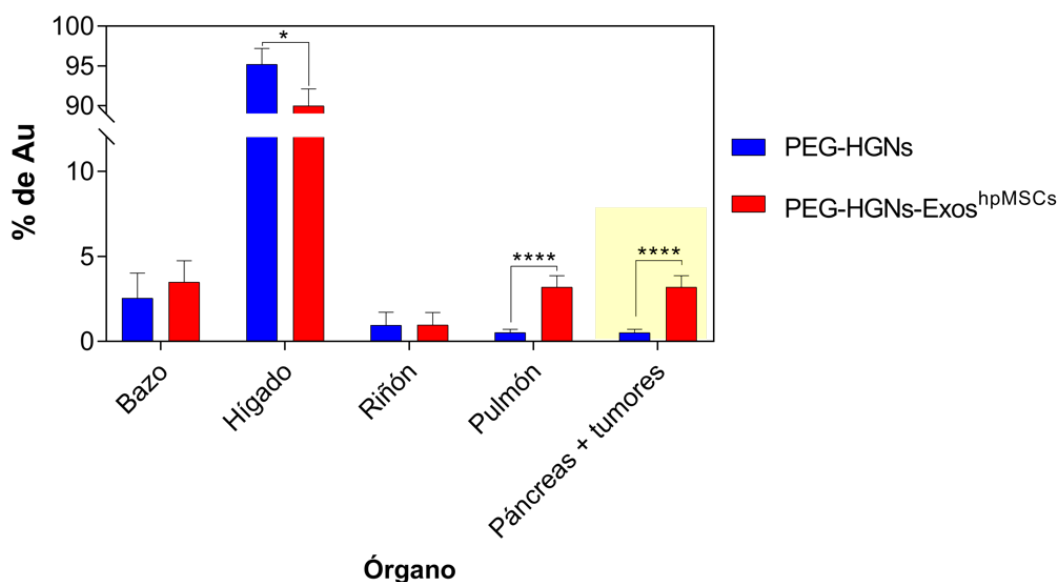


Figura 8.14. Resultados de ICP-MS cuantificando la cantidad de oro para evaluar la biodistribución de las PEG-HGNs administradas de forma libre o encapsuladas en los exosomas (PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs}), en el modelo multinodular tras 72 horas de su administración intravenosa en la cola de los animales.

Al evaluar la cantidad de oro presente en los órganos de los animales a los que se les administraron las PEG-HGNs en forma libre (sin encapsularlas en exosomas), los porcentajes de acumulación fueron: hígado ($95,2 \pm 1,9 \%$), bazo ($2,5 \pm 1,4 \%$), riñones ($0,96 \pm 0,75 \%$), páncreas conteniendo los nódulos cancerosos ($0,74 \pm 0,3 \%$) y, por último, pulmones ($0,5 \pm 0,2 \%$). Por tanto, puede concluirse que la biodistribución de las PEG-HGNs administradas de forma libre fue similar en el caso de los animales con un tumor sólido xenograft y en animales con el modelo metastásico implantado en el peritoneo. Por tanto, el análisis por ICP-MS de la cantidad de oro presente en cada uno de los órganos estudiados cuando las PEG-HGNs estaban encapsuladas en los exosomas o bien administradas desnudas, reveló una acumulación preferente de éstas en los múltiples nódulos en el páncreas cuando eran encapsuladas. Este tropismo diferencial por las áreas tumorales, era aportado por los exosomas, como en el caso del xenograft. En el bazo, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ambas partículas administradas y, por lo contrario, la cantidad de Au en el hígado disminuyó cuando las PEG-HGNs se administraron encapsuladas en los exosomas comparado con su forma libre. Hoy en día, dirigir terapias a áreas metastásicas supone un gran reto. Estos resultados abren la posibilidad de dirigir y direccionar las partículas hacia múltiples nódulos localizados en el páncreas (simulando nódulos metastásicos) gracias a su encapsulación en exosomas derivados de células madre mesenquimales. De nuevo, al igual que en el caso del modelo xenograft, se observó un tropismo diferencial hacia los pulmones por parte de los exosomas. Al igual que en el caso anterior, es posible que parte del oro encontrado en el hígado esté asociado a las partículas que no se lograron encapsular en los exosomas durante su purificación a partir de los cultivos celulares. Además, parte de la migración de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} al hígado puede deberse a la rigidez de estas vesículas aportada por las partículas, lo que favorecería su paso hacia el hígado, e impediría su extravasación a otras zonas del organismo.

El análisis histopatológico de los diferentes órganos de los animales con el modelo multinodular, tampoco reveló daños ni alteraciones provocados por la acumulación de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en los diferentes tejidos. La **figura 8.15** incluye imágenes de la técnica inmunohistoquímica de H&E de los diferentes órganos analizados pasadas 72 horas y 1 semana de la administración de los exosomas. Al igual que en el caso del modelo de xenotrasplante, todos los órganos presentaron estructuras histológicas características (previamente descritas) y en ninguno de ellos se observaron daños degenerativos ni necróticos derivados de la presencia de los PEG-HGNs-

Exos^{hpMSCs}, ni tan siquiera en el hígado donde no se evidenció ningún indicador de hepatotoxicidad producida por la acumulación de los exosomas cargados con las NPs.

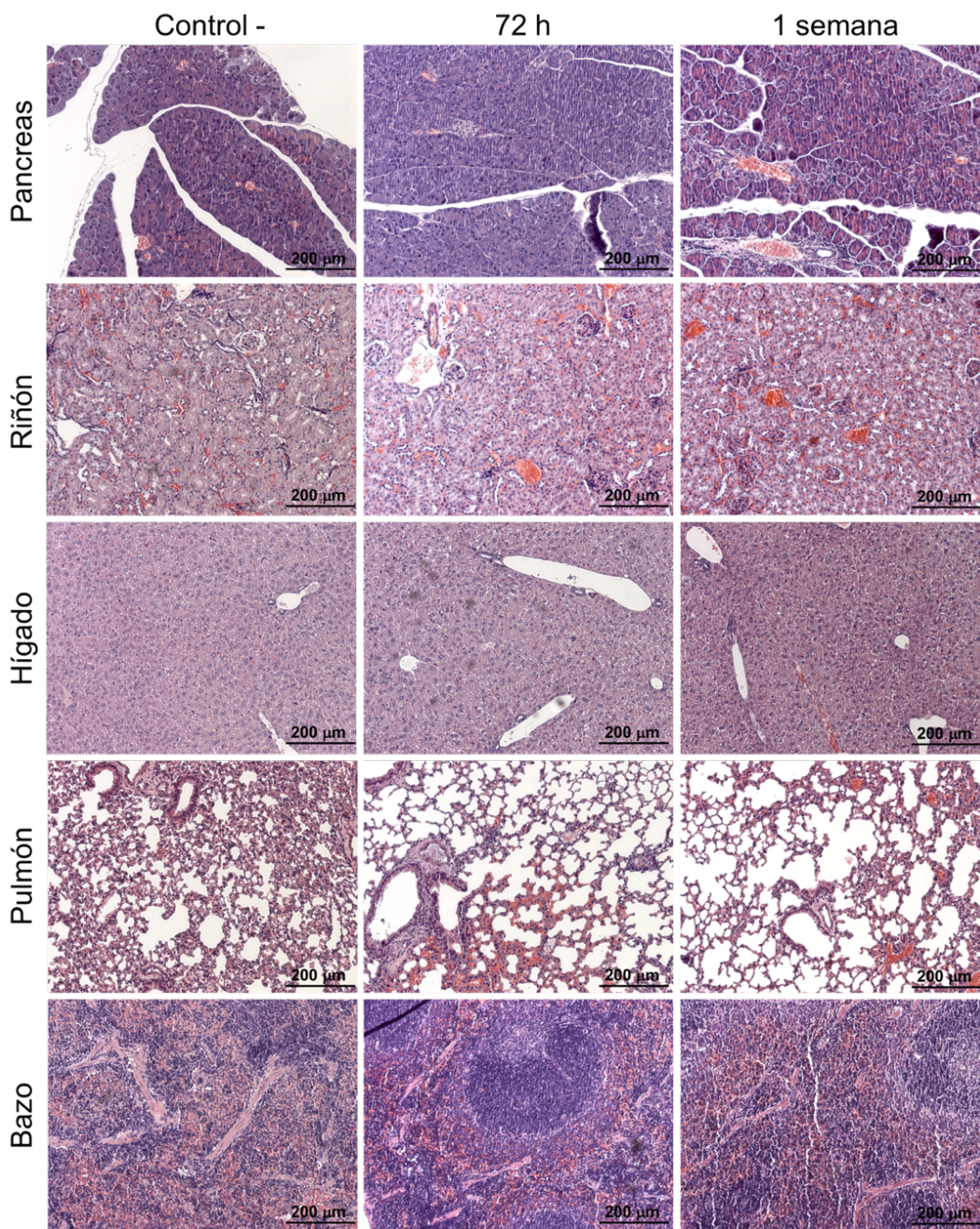


Figura 8.15. Resultados de la tinción de H&E de secciones recogidas pasadas 72 horas y 1 semana de la administración de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} (en los animales con el modelo multinodular) de los órganos estudiados (tumor, riñón, páncreas, hígado, pulmón y bazo). 60x.

8.3.5. Hipertermia óptica mediada por los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} *in vivo*

Una vez comprobada la capacidad de las PEG-HGNs de migrar más eficazmente a los tumores cuando estaban encapsuladas en exosomas en lugar de administrarse de forma libre; y averiguado el tiempo máximo de acumulación de estos PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en ambos modelos tumorales, se procedió a la evaluación de la capacidad

fototérmica de este vector para eliminar y erradicar tumores de ambos modelos *in vivo*. Para ello, se inyectaron 100 µg de PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en la vena de la cola de los animales (exactamente igual que en los ensayos de biodistribución). Dentro de cada modelo tumoral, los animales se dividieron en los grupos indicados en la **tabla 8.1**.

En el caso de los ratones con el tumor xenograft (modelo de tumor primario sólido), estos se irradiaron pasadas 48 horas de la inyección de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs}, por su parte en el caso de los animales con el modelo multinodular, se les aplicó el láser NIR pasadas 72 horas de la administración del vector. En ambos tiempos se observó una acumulación máxima de los vectores en las áreas tumorales de ambos modelos animales, respectivamente, por lo que se irradiaron con el láser NIR a esos tiempos con el objetivo de maximizar su efecto. En los grupos sometidos a la irradiación NIR, esta fue aplicada durante 5 minutos con una potencia de 2,2 y 1,5 W para el tumor xenograft y para el modelo multinodular, respectivamente. En el caso del modelo multinodular, se realizó un pequeño corte con ayuda de una microtijera quirúrgica para poder introducir la sonda del láser intraperitonealmente y alcanzar la zona del páncreas donde se hallaban las múltiples regiones tumorales. Pasada una semana de la primera administración de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs}, se realizó una segunda inoculación de 100 µg de los mismos y su correspondiente segunda irradiación de los tumores (en el caso del xenograft tras 48 h y en el modelo multinodular pasadas 72 horas). La evolución del tamaño tumoral en ambos modelos animales se siguió a lo largo del tiempo. En el caso del tumor xenograft, se evaluó con ayuda de un calibre, mientras que, en el caso del modelo multinodular, se analizó cuantificando la bioluminiscencia de las células tumorales en el equipo IVIS.

A continuación, se describen en primer lugar los resultados relativos a la terapia por hipertermia óptica mediada por los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en el modelo de xenotrasplante y por último en el modelo multinodular.

La **figura 8.16** muestra fotografías de la secuencia experimental seguida para el tratamiento de los tumores xenograft con el láser NIR: A) tumor antes de someterse al tratamiento. B) Tumor siendo irradiado durante la primera aplicación del láser, C) Tumor inmediatamente después de irradiar donde puede observarse una cierta inflamación y rojez debido a la filtración de líquido y a la vasodilatación tras la quemadura producida por el calentamiento de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} tras ser irradiadas. D) Tumor una semana después del tratamiento, tiempo al cual se está produciendo la recuperación y reconstrucción del tejido previamente irradiado. Puede observarse como los bordes de la quemadura tiran hacia la zona interna y la herida se va haciendo más pequeña,

formándose nueva piel sobre este tejido con la ayuda de glóbulos blancos y colágeno. *E*) Segunda irradiación 48 horas después de la segunda administración intravenosa de los exosomas. Para asegurarnos de la completa eliminación de las células tumorales, la segunda irradiación se centró en la zona circundante del tumor, exactamente en las mismas condiciones que el primer tratamiento con el láser. *F*) Fotografía del tumor tras la segunda irradiación donde puede observarse la inflamación producida por el calentamiento de las PEG-HGNs encapsuladas en los exosomas en el tumor.

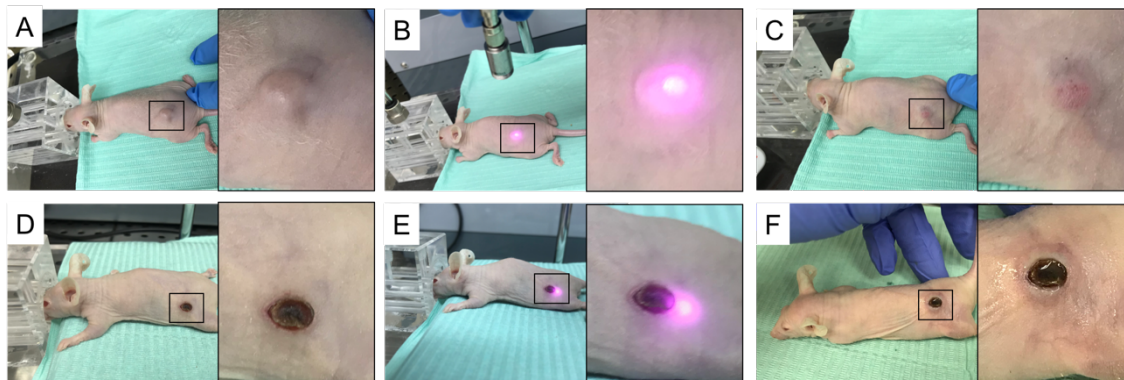


Figura 8.16. Fotografías del tratamiento experimental para la eliminación de un tumor xenograft en el flanco lateral de un ratón a través de hipertermia óptica mediada por los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs}.

Como muestra la **figura 8.17.A**, los tumores de los animales de los tres grupos control (sin PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} y sin láser; con PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs}, pero sin aplicar el láser; y sin láser, pero sin la administración de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs}) aumentaron de tamaño progresivamente a lo largo del tiempo. Sin embargo, después de la segunda irradiación, el grupo que fue irradiado con el láser NIR y que había recibido la inyección de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs}, experimentó una disminución estadísticamente significativa del tamaño del tumor, sugiriendo que los exosomas no sólo vehiculizaban las partículas fototerapéuticas a los tumores, sino que, además, éstas preservaban su potencial para ser irradiadas y provocar la muerte de las células cancerosas del tejido tumoral de manera localizada. Los tamaños de los tumores de los ratones de los diferentes grupos al finalizar el estudio se encuentran en la **figura 8.17.B**. La **figura 8.17.C** muestra fotografías de los tumores de dos ratones tratados con PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} y sometidos a la irradiación, donde se evidencia una herida ya en forma de costra como consecuencia del aumento de temperatura provocado, así como una disminución significativa del tamaño del tumor comparado con su tamaño inicial. El promedio de los tamaños tumorales el último día del experimento se recoge en la **tabla 8.3**. Estos resultados sugieren que los exosomas podrían actuar como vehículos muy eficaces de partículas terapéuticas a los tumores, mejorando el conocido efecto EPR

que se produce por la inyección intravenosa de las NPs desnudas. La efectividad del efecto EPR depende significativamente del tipo de tumor, y se ha descrito una gran variabilidad de su efecto en diferentes ensayos clínicos, cuestionando su eficacia terapéutica.^{421,422} Además, los resultados mostrados en esta memoria sugieren que el uso de exosomas en vez de las propias células secretoras, es significativamente más eficaz y presenta numerosas ventajas, ya que se trata de vesículas de menor complejidad biológica que las células completas, con menor inmunogenicidad y menor tamaño, favoreciendo su acumulación en los tumores más eficazmente.¹⁷²

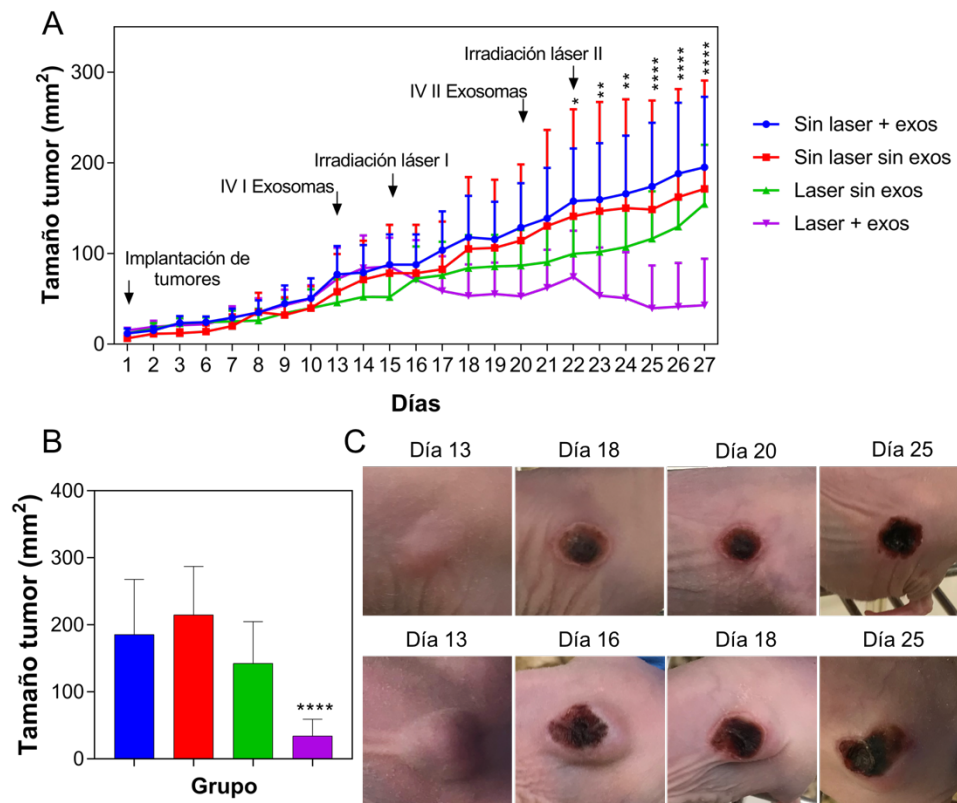


Figura 8.17. A) Evolución del tamaño tumoral a lo largo del tiempo en los diferentes grupos experimentales dentro del modelo xenograft. B) Tamaño de los tumores a tiempo final. C) Fotografías tomadas durante toda la duración del experimento, desde el primero hasta el último día, observándose la aparición de una quemadura y una disminución del tamaño del tumor como consecuencia de un incremento de temperatura causada por la acumulación de las PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en el tumor y su posterior irradiación con el láser NIR.

Tabla 8.3. Tabla recogiendo el tamaño final de los tumores de los diferentes grupos experimentales.

Grupo	Tamaño del tumor al terminar el estudio (mm²)
Control 1) sin PEG-HGNs-Exos ^{hpMSCs} y sin laser	215 ± 72,1
Control 2) con PEG-HGNs-Exos ^{hpMSCs} y sin laser	185,9 ± 81,96
Control 3), sin PEG-HGNs-Exos ^{hpMSCs} y con laser	142,4 ± 62,4
Con PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} y con láser	34,05 ± 25,1

La **figura 8.18** muestra la monitorización de la temperatura durante las dos irradiaciones realizadas a los animales con el modelo xenograft, tanto en ausencia como en presencia de PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs}. Los resultados demuestran como en ambas irradiaciones, tras 2,5 minutos de aplicación del laser se produjo un aumento de temperatura de 7 °C únicamente en el grupo de ratones tratado previamente con los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs}. Al finalizar la irradiación pasados los 5 minutos, la temperatura llegó a alcanzar los 45 °C en la región tumoral. Por el contrario, en el caso de los ratones que no habían recibido la administración de los exosomas, la temperatura aumentó únicamente 5 grados desde el inicio de la irradiación. Este aumento de temperatura inespecífico es inherente al propio láser y no causó un incremento lo suficientemente grande como para provocar la muerte de las células.

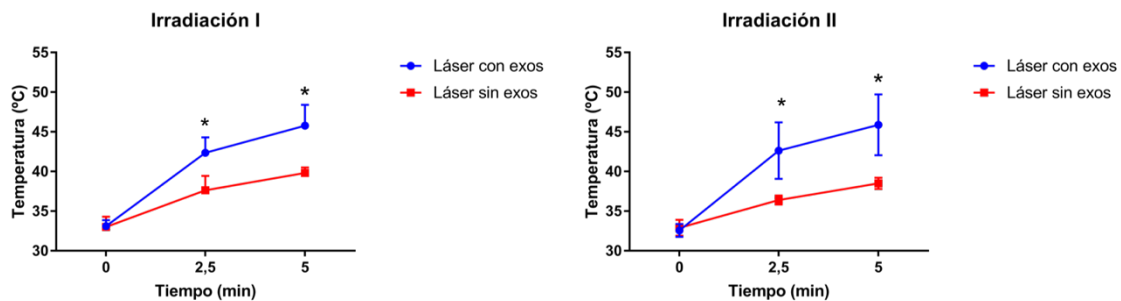


Figura 8.18. Medición de la temperatura en el tumor durante la aplicación del láser en el tumor de ratones tratados con PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} y en ratones control durante los dos ciclos de irradiación.

En el caso del modelo multinodular, en primer lugar, se optimizaron las condiciones de aplicación del láser en estudios preliminares *ex vivo*. La **figura 8.19** muestra la irradiación de hígado, páncreas y bazo con la fibra del láser radial empleada en el modelo multinodular mientras se monitorizaba la temperatura. Estos resultados demuestran un aumento de temperatura progresivo cuando se incrementaba la potencia del láser en los tres órganos. Se eligió la potencia de 1,5 W para llevar a cabo el experimento de hipertermia óptica *in vivo*.

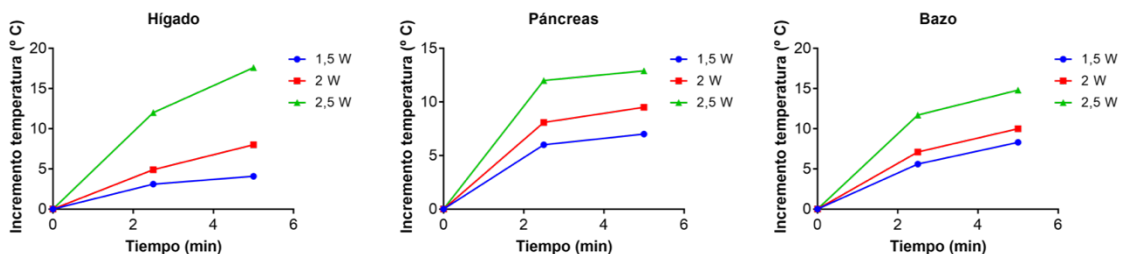


Figura 8.19. Ensayo preliminar para optimizar la potencia del láser empleada para llevar a cabo el experimento de hipertermia óptica *in vivo* en los nódulos cancerosos intraperitoneales, localizados principalmente en el páncreas.

En este modelo animal, las múltiples regiones cancerosas no se irradiaron externamente ya que se encontraban en el peritoneo adheridas o englobadas principalmente en el páncreas. Por ello, se realizó una pequeña incisión con una microtijera quirúrgica para introducir una fibra diferente a la empleada en el modelo anterior (ver **figura 8.4** y **figura 8.20.A**). Una vez aplicado el láser durante 5 min con una potencia de 1,5 W, se realizaron uno o dos puntos de sutura (dependiendo de la longitud de la incisión). A los animales se les administró subcutáneamente analgesia inmediatamente después de la operación (**figura 8.20.B**). Pasadas 24 h de la incisión, la herida comenzó a cicatrizar (**figura 8.20.C**), y al cabo de una semana, ésta estaba completamente cerrada y cicatrizada (**figura 8.20.D**). A este tiempo, se realizó una segunda administración intravenosa de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} y su correspondiente irradiación con el láser NIR tras 72 horas.

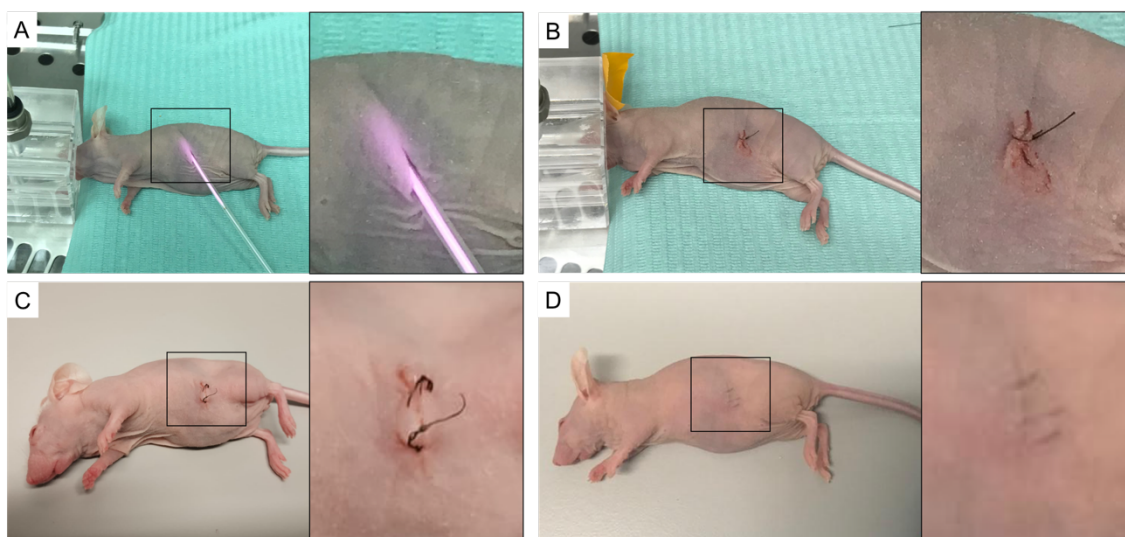


Figura 8.20. Fotografías del tratamiento experimental para la eliminación de los nódulos tumorales en el páncreas de los por hipertermia óptica mediada por los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs}.

Al igual que en el modelo anterior, las diferencias en los tamaños (cuantificadas a partir del nivel de bioluminiscencia de las células cancerosas) entre los diferentes grupos empezaron a ser visibles aproximadamente a partir del día 19 y tras el segundo tratamiento (**figura 8.21.A**). La bioluminiscencia de los nódulos cancerosos de los diferentes grupos de animales a tiempo final, se encuentra en la **figura 8.21.B**. En la **figura 8.21.C** se recogen imágenes representativas de bioluminiscencia de IVIS de dos animales tratados con los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} e irradiados con el láser desde el inicio hasta el final del experimento completo. Como puede observarse, la intensidad de luminiscencia, y por tanto la viabilidad de las células tumorales y en consecuencia el tamaño y cantidad de los nódulos disminuyó a lo largo del tiempo. En el caso inferior, incluso se observó la reducción y eliminación completa de las zonas tumorales en el

páncreas al término del experimento tras las dos administraciones de los exosomas y las correspondientes irradiaciones con el láser NIR.

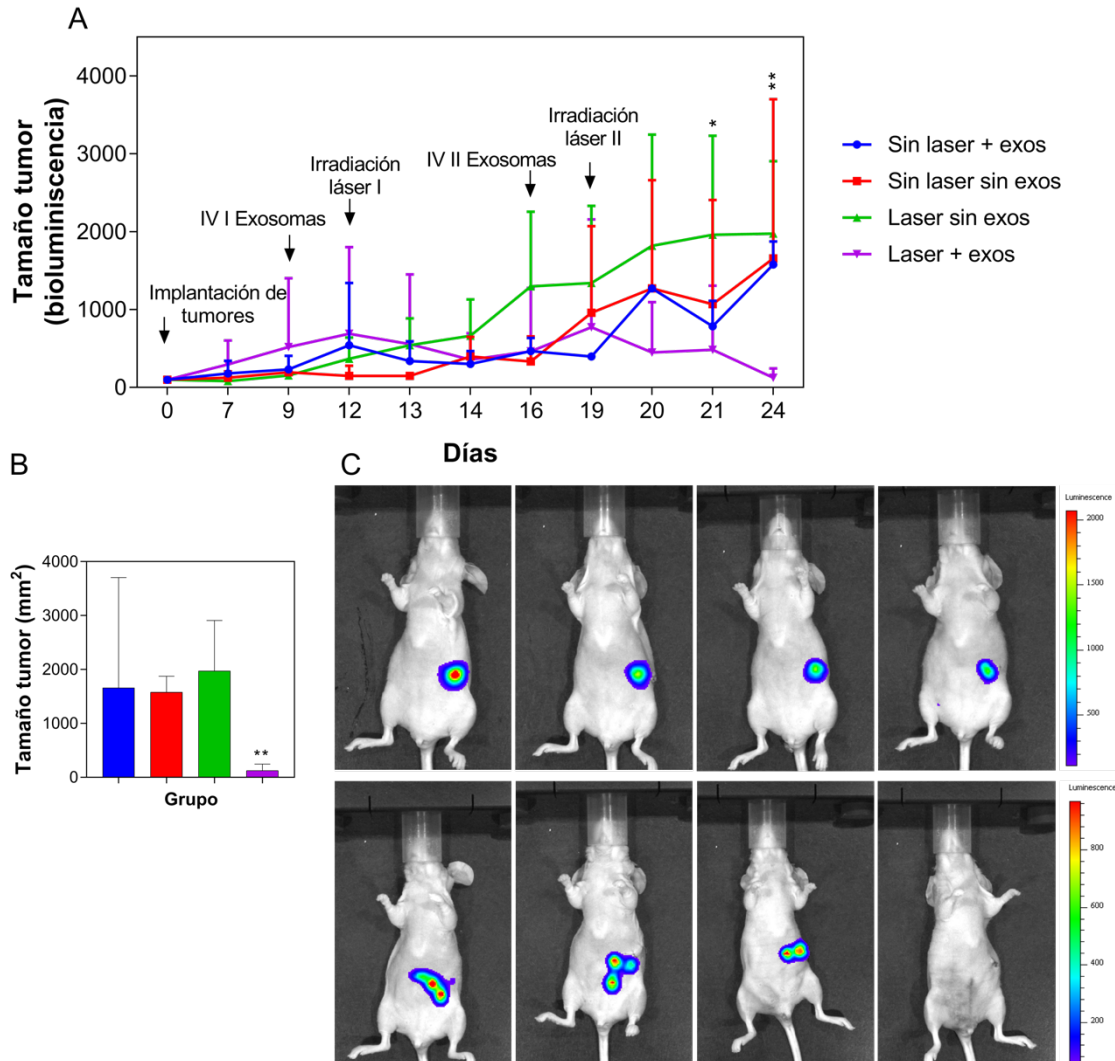


Figura 8.21. A) Seguimiento del tamaño y del número de nódulos tumorales pancreáticos a lo largo del tiempo en los diferentes grupos experimentales. B) Bioluminiscencia de nódulos tumorales a tiempo final. C) Imágenes de IVIS realizadas durante toda la duración del experimento, desde el primero hasta el último día, observándose la disminución progresiva de la bioluminiscencia de las células tumorales, hasta en algunos casos, su completa eliminación, debido a un incremento de temperatura causada por la acumulación de las PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en el tumor y su posterior irradiación con el láser NIR.

La **figura 8.22** recoge las temperaturas alcanzadas durante los dos ciclos de aplicación del láser intraperitonealmente en animales tratados con PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} y en animales control. En ambas irradiaciones, tras 2,5 y 5 minutos, la temperatura aumentó hasta más de 40 °C únicamente en el grupo de ratones tratado con el vector exosomal. En el caso de los ratones que no habían recibido la administración de los exosomas con las partículas, la temperatura aumentó únicamente 2 °C desde el inicio de la irradiación. Cabe destacar que en este caso se observó un

aumento de la temperatura menos evidente y marcado (aunque estadísticamente significativo comparado con el control). Esto se debe a que la medición de la temperatura no se realizó intratumoralmente sino externamente. Además, con el objetivo de no dañar órganos internos esenciales, la potencia de aplicación del laser en el caso del modelo (1,5 W) multinodular fue menor a la empleada para tratar los ratones xenograft (2 W).

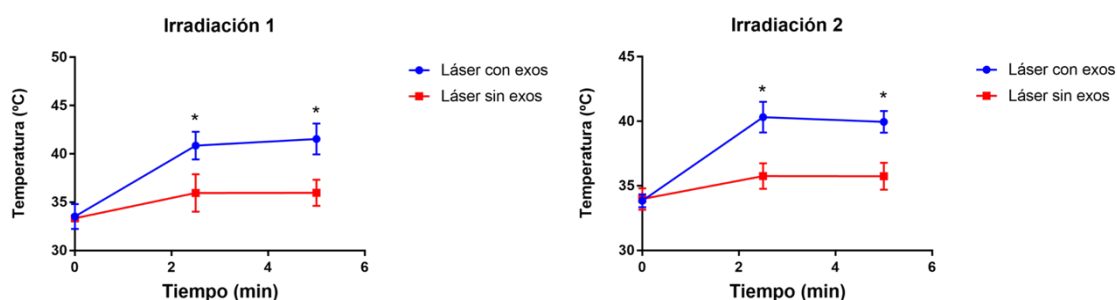


Figura 8.22. Seguimiento de la temperatura en el área irradiada durante la aplicación del intraperitonealmente en ratones tratados con PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} y en ratones control durante los dos ciclos de irradiación.

Los resultados mostrados en este capítulo han demostrado la habilidad de los exosomas derivados de MSCs para alcanzar e implantarse en el estroma tumoral, acumulando mayores cantidades de NPs terapéuticas en la diana de interés. En concreto, se ha conseguido la remisión casi completa del tamaño tumoral en tumores sólidos subcutáneos, pero, además, también se ha logrado erradicar y frenar la progresión y diseminación de áreas cancerosas multinodulares simulando neoplasias en etapas metastásicas avanzadas, lo que supone un reto mayor frente al tratamiento de un tumor primario. Para corroborar esta hipótesis y verificar la eficacia del tratamiento en ambos modelos tumorales, se llevó a cabo un análisis histopatológico. Concretamente, se realizó una tinción inmunohistoquímica de la proteína Ki-67. Se trata de un antígeno nuclear que se utiliza como marcador de proliferación celular, cuya expresión en tumores se ha correlacionado con un aumento en la velocidad de crecimiento de dichas células cancerosas. En concreto, se expresa en las células que se preparan para dividirse y dar lugar a células hijas, por lo que es ampliamente empleado como biomarcador de proliferación para estimar ratios de crecimiento, ya que a través de una tinción colorimétrica inmunohistoquímica permite medir el porcentaje de células tumorales que expresan esta proteína. Por tanto, a mayor número de células positivas (que expresan Ki-67), mayor es la velocidad con la que se dividen para dar lugar a nuevas células tumorales. El análisis inmunohistoquímico de la expresión de Ki-67 (en el área central de los tumores primarios del modelo de xenotrasplante, y en las

regiones cancerosas del modelo multinodular recogidos al final del experimento en los diferentes grupos animales), evidenció que los tumores de los grupos que no habían recibido ni exosomas ni láser, exosomas sin láser o láser sin exosomas, presentaban una expresión significativamente menor de Ki-67 comparado con el grupo que recibió la inyección de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} y la posterior irradiación con el láser NIR (**figura 8.23**). La **tabla 8.4** recogen los porcentajes de células negativas y positivas para la tinción de la proteína Ki-67.

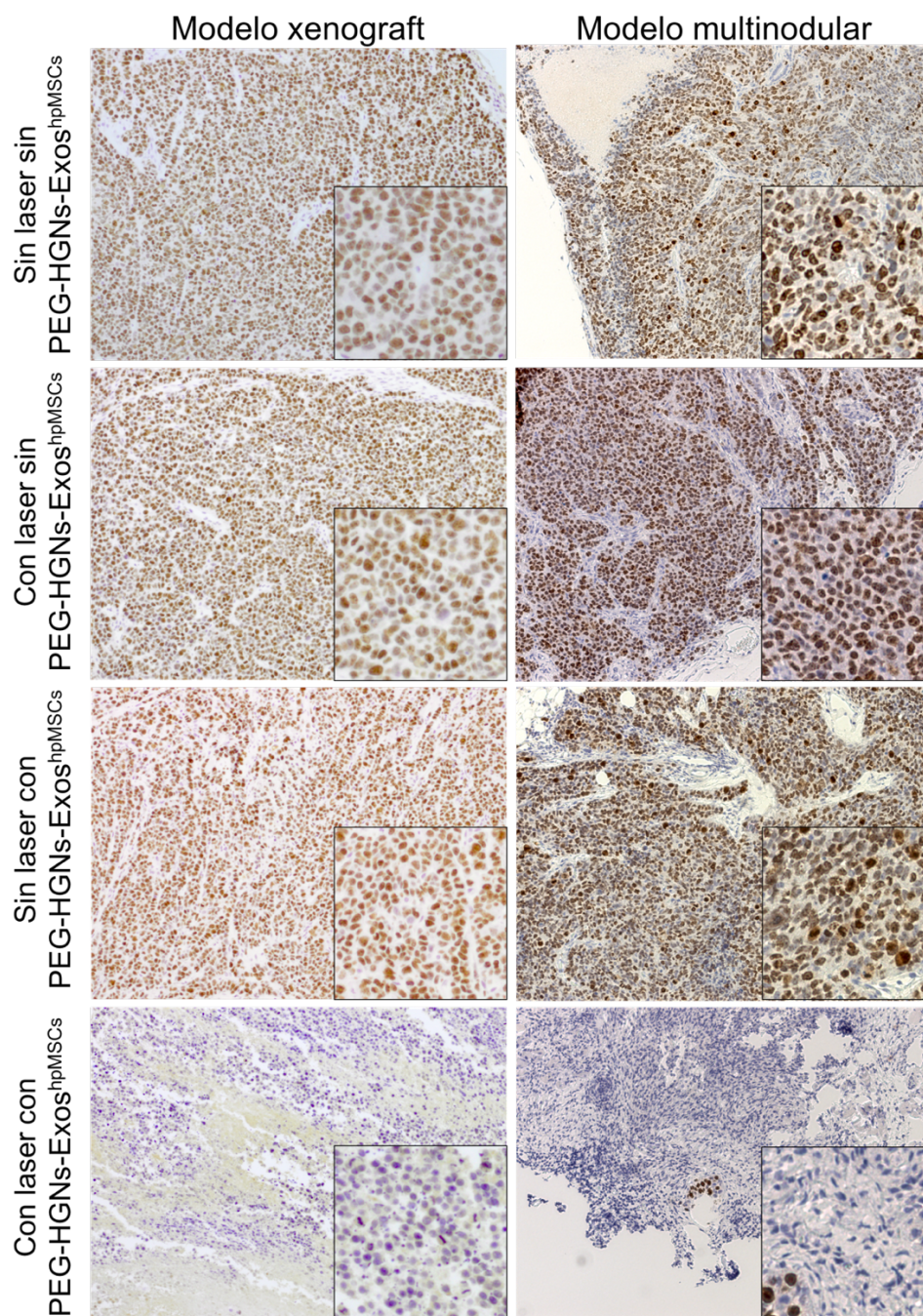


Figura 8.23. Resultados de la tinción de Ki-67 de los tumores xenograft, y de múltiples áreas cancerosas localizadas en el páncreas, en los animales con el modelo xenograft y con el modelo multinodular, respectivamente.

Tabla 8.4. Tabla conteniendo los porcentajes de células negativas y positivas para Ki-67 de el tumor de los animales con el modelo de xenotrasplante y con el modelo multinodular.

	Grupo	% de células Ki-67 positivas
Modelo xenograft	Control 1) sin PEG-HGNs-Exos ^{hpMSCs} y sin laser	90,93 ± 14,4
	Control 2) con PEG-HGNs-Exos ^{hpMSCs} y sin laser	96,32 ± 5,85
	Control 3), sin PEG-HGNs-Exos ^{hpMSCs} y con laser	93,59 ± 9,28
	Con PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} y con láser	1,40 ± 2,19
Modelo multinodular	Control 1) sin PEG-HGNs-Exos ^{hpMSCs} y sin laser	86,15 ± 17,45
	Control 2) con PEG-HGNs-Exos ^{hpMSCs} y sin laser	66,88 ± 22,77
	Control 3), sin PEG-HGNs-Exos ^{hpMSCs} y con laser	65,3 ± 28
	Con PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} y con láser	5,93 ± 5,41

Estos datos indican que en los ratones tratados con el láser a los que se les habían administrado previamente los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} no se observaron casi células positivas para Ki-67 y se pudieron visualizar áreas necróticas compatibles con la muerte de las células cancerosas, provocada por un aumento de la temperatura asociada al tratamiento. Estos resultados evidencian la eficacia de esta terapia basada en exosomas combinadas con AuNPs con propiedades de hipertermia óptica, combinadas con un láser en el rango NIR. Además, estos resultados sugieren la posibilidad de un pronóstico favorable de la evolución tumoral tras la aplicación de la terapia fototérmica.

8.4. Conclusiones

Los ensayos de biodistribución de los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} en un modelo de tumor primario (xenotrasplante) y en un modelo similar a un cáncer metastásico (multinodular) muestran una mayor acumulación estadísticamente significativa de las partículas plasmónicas cuando éstas se encapsulaban en exosomas en lugar de administrarse de forma libre. Los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} localizados en las áreas cancerosas en ambos modelos animales son capaces de provocar un aumento de temperatura cuando son excitados con un laser NIR de 808 nm y transformar esta energía luminosa en energía térmica, provocando la muerte de las células tumorales circundantes de manera localizada. En análisis de la proteína Ki-67 para evaluar la eficacia del tratamiento y el pronóstico de los animales, demuestran que la irradiación con el laser NIR de los tumores conteniendo los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} son un

tratamiento muy eficaz, provocando la erradicación de casi la totalidad de células malignas.

Estos resultados abren la posibilidad de desarrollar una nueva estrategia eficaz para abordar el tratamiento tanto de tumores en fases tempranas como en fases tardías, lo que hoy en día todavía supone un reto.

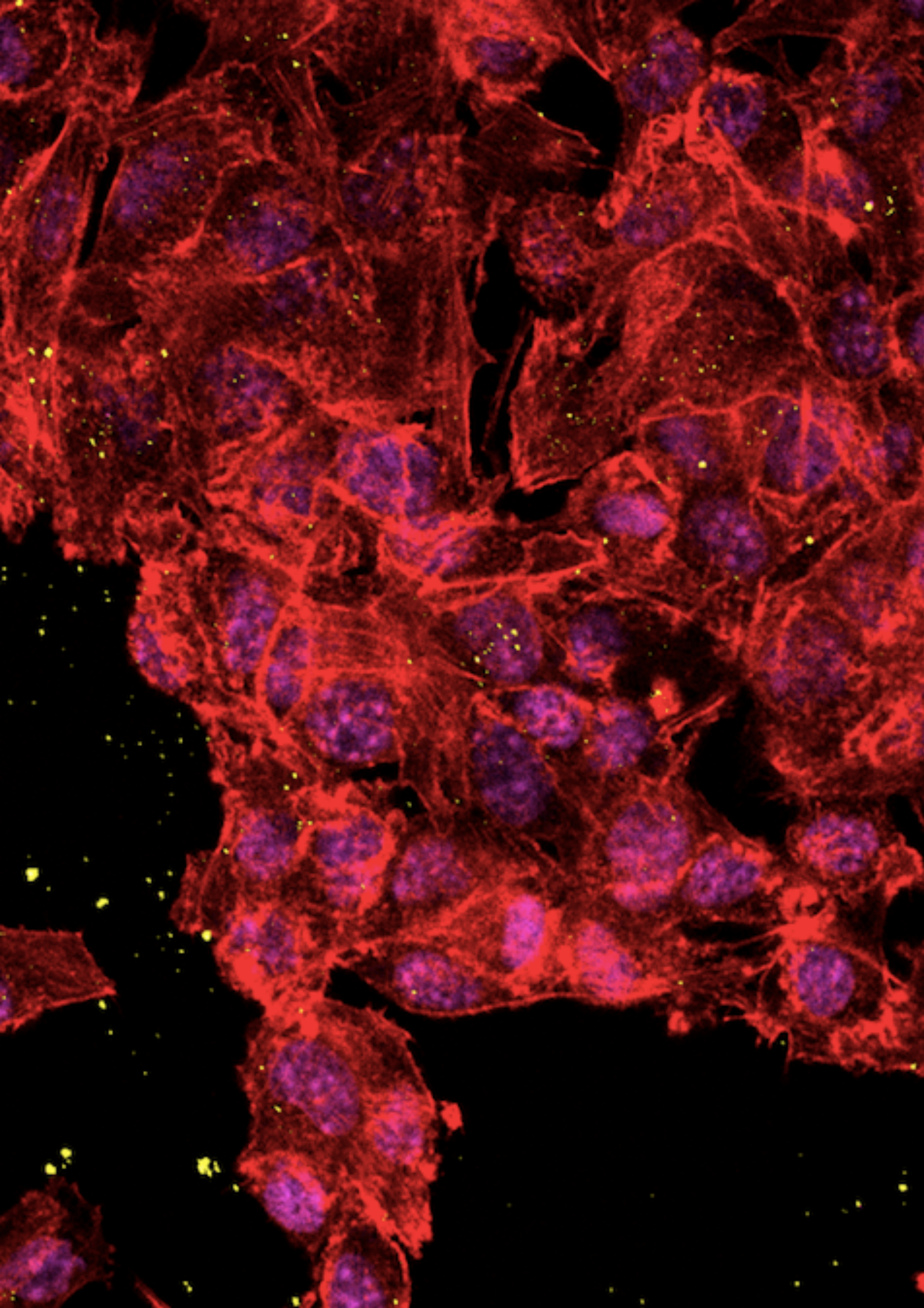


Imagen de microscopía confocal de células de melanoma B16-F10.
Marcaje de la actina (rojo), HGNs (amarillo) y núcleos (magenta).

9. Conclusiones

A. Conclusiones generales

B. Main conclusions

9.A. CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones específicas de este trabajo se han indicado en la sección final de cada capítulo. Aquí se exponen las conclusiones generales obtenidas, estructuradas siguiendo las áreas principales de trabajo discutidas en los capítulos anteriores: 1) estrategias para la encapsulación de nanomateriales dentro de los exosomas, 2) aplicación de exosomas cargados con NPs para el tratamiento de tumores, y 3) técnicas de diagnóstico e imagen de áreas cancerosas basadas en los exosomas cargados con NPs.

Estrategias para la encapsulación de los nanomateriales dentro de los exosomas.

1. Los exosomas pueden aislarse a partir de cultivos de diferentes líneas celulares mediante ciclos de ultracentrifugación sucesivos, tanto en ausencia como en presencia de NPs.
2. Los métodos fisicoquímicos de encapsulación forzada de las PEG-HGNs (sonicación, choque térmico, incubación a temperatura ambiente en ausencia y presencia de saponina y electroporación), dan lugar a eficacias de encapsulación de las PEG-HGNs en exosomas relativamente bajas, y por lo general, causan daños en la membrana exosomal.
3. El método de carga indirecta de partículas plasmónicas (PEG-HGNs) a través de la captación natural por parte de las células parentales (tanto cancerosas como células madre) alcanza mejores rendimientos de encapsulación y, además, mantiene la integridad de la membrana exosomal, por lo que se considera un método preferible a los métodos de encapsulación forzada.
4. La molécula hidrofóbica *Perfecta* puede encapsularse eficazmente en exosomas utilizando el mecanismo natural de su biogénesis tras la incubación de la misma en forma de emulsión con lecitina.
5. El empleo de CO como agente reductor de diferentes precursores metálicos da lugar a la generación de nanoestructuras de metales nobles (AuNPs, PdNSs y PtNPs) en el interior de exosomas, preservando la integridad, morfología, estructura y funcionalidad de la membrana exosomal.

Técnicas de diagnóstico e imagen de áreas cancerosas basadas en los complejos híbridos de exosomas y NPs.

6. Los *Perfecta-Exos*^{mMSCs} se acumulan en tumores xenograft *in vivo*, sirviendo como agentes de contraste no invasivos de imagen por ¹⁹F-MRI.
7. Las técnicas de microfluídica diseñadas en esta memoria permiten la captura de exosomas y su separación a partir de diferentes fluidos a través de una captura magnética de inmunoafinidad. En concreto, se han aislado exitosamente exosomas a partir de sangre entera periférica de pacientes con CP sin necesidad de ningún pretratamiento adicional, sirviendo como elementos no invasivos y fiables para el diagnóstico y seguimiento de este tipo de tumores.

Aplicación de los exosomas cargados con las NPs para el tratamiento de tumores.

8. Los complejos PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} y PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} se internalizan preferentemente en el citoplasma de sus células parentales, incluso cuando éstas son co-cultivadas con otras líneas celulares, mediando su muerte selectiva *in vitro* por hipertermia óptica.
9. El uso de exosomas como vehículos transportadores de NPs a tumores permite acumular más eficazmente las terapias en las áreas neoplásicas comparado con la administración de las partículas libres recubiertas con PEG, es decir, mejora significativamente el direccionamiento efecto EPR.
10. La irradiación con un láser NIR de tumores primarios en un modelo de xenotrasplante, así como de áreas neoplásicas en un modelo multinodular intraperitoneal en animales previamente tratados intravenosamente con los PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs}, produce una reducción significativa del tamaño de dichos tumores.
11. Los Pt-Exos presentan propiedades citotóxicas específicas capaces de producir la muerte selectiva de líneas celulares diana (correspondientes a las células parentales secretoras de los correspondientes exosomas).

9.A. Conclusiones generales

12. Los Pd-Exos son capaces de mediar catalíticamente la activación bioortogonal intracelular del Panobinostat® en células tumorales de manera selectiva, gracias a la especificidad en la entrega del catalizador mediada por exosomas de las propias células.

9.B. MAIN CONCLUSIONS

The specific conclusions of this work were presented in the corresponding chapters. Here, we present the general conclusions classified in three main areas of work: 1) strategies for the encapsulation of nanomaterials within exosomes, 2) application of nanoparticle loaded exosomes for cancer treatment, and 3) techniques for tumor diagnosis and imaging with exosome-nanoparticle hybrids.

Strategies for the encapsulation of nanomaterials within exosomes.

1. Exosomes can be isolated by ultracentrifugation cycles from cell cultures, both in the presence or absence of nanoparticles in the culture media.
2. The physicochemical methods for forced encapsulation tested in this work (sonication, thermal shock, incubation at room temperature, incubation assisted by saponin and electroporation), gave relatively low loading yields for PEG-HGNs, and caused damage to the exosomal membrane.
3. The natural biogenesis pathway of exosomes, is highly efficient to achieve the encapsulation of plasmonic nanoparticles (PEG-HGNs) into exosomes derived from tumoral and from mesenchymal stem cells, and allows to preserve the integrity of the exosomal membrane. It is thus considered a superior technique in comparison with forced encapsulation methods.
4. The *Perfecta* hydrophobic molecule is efficiently incorporated in Exos^{mMSCs} using the natural exosome biogenesis pathway, by incubation as a lecitin emulsion.
5. Noble metals nanostructures (Pd-NPs, Au-NPs and Pt-NPs) can be generated inside exosomes using a mild methodology that is based on CO-mediated reduction of the corresponding ionic precursor directly inside the extracellular vesicles. This procedure preserves the integrity, morphology, structure and functionality of the exosomal membrane.

Techniques for tumor diagnosis and imaging with exosome-nanoparticle hybrids.

6. *Perfecta*-Exos^{mMSCs} are able to successfully accumulate in xenograft tumors, serving as a promising and non-invasive contrast agent tool by ¹⁹F-MRI.
7. The microfluidic techniques developed in this work use magnetic nanoparticles covered with an exosomal antibody for the isolation of exosomes from different fluids, including whole blood obtained from pancreatic cancer patients without the need of any pretreatment. The results show the potential use of exosomes as reliable and non-invasive tools for diagnosis of pancreatic cancer.

Application of nanoparticle loaded exosomes for cancer treatment.

8. PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} and PEG-HGNs-Exos^{B16-F10} are efficiently internalized, transferring therapeutic material into the targeted cells (i.e. parental cells from which they are derived), demonstrating selective *in vitro* optical hyperthermia therapy based on exosome delivery of NIR-responding plasmonic nanoparticles.
9. The use of exosomes as vectors to deliver PEG-HGNs to tumor areas, accumulates more efficiently the nanoparticles in the neoplastic areas compared with the free administered PEG-HGNs. It represents a significant improvement compared to delivery by EPR effect.
10. PEG-HGNs-Exos^{hpMSCs} act as efficient transducers *in vivo* of near infrared light into heat when intravenously injected (in a xenograft mice model and in animals with a multinodular intraperitoneal model), leading to the death of cancer cells and to the reduction of the tumors in both animal models.
11. Pt-Exos present specific cytotoxic properties for cancer treatment, leading to selective *in vitro* cell death by exosome mediated delivery.
12. Pd-Exos maintain the targeting capabilities of exosomes and are able to perform biorthogonal uncaging reactions in the target cells through the *in situ* activation of the anti-cancer drug Panobinostat®.

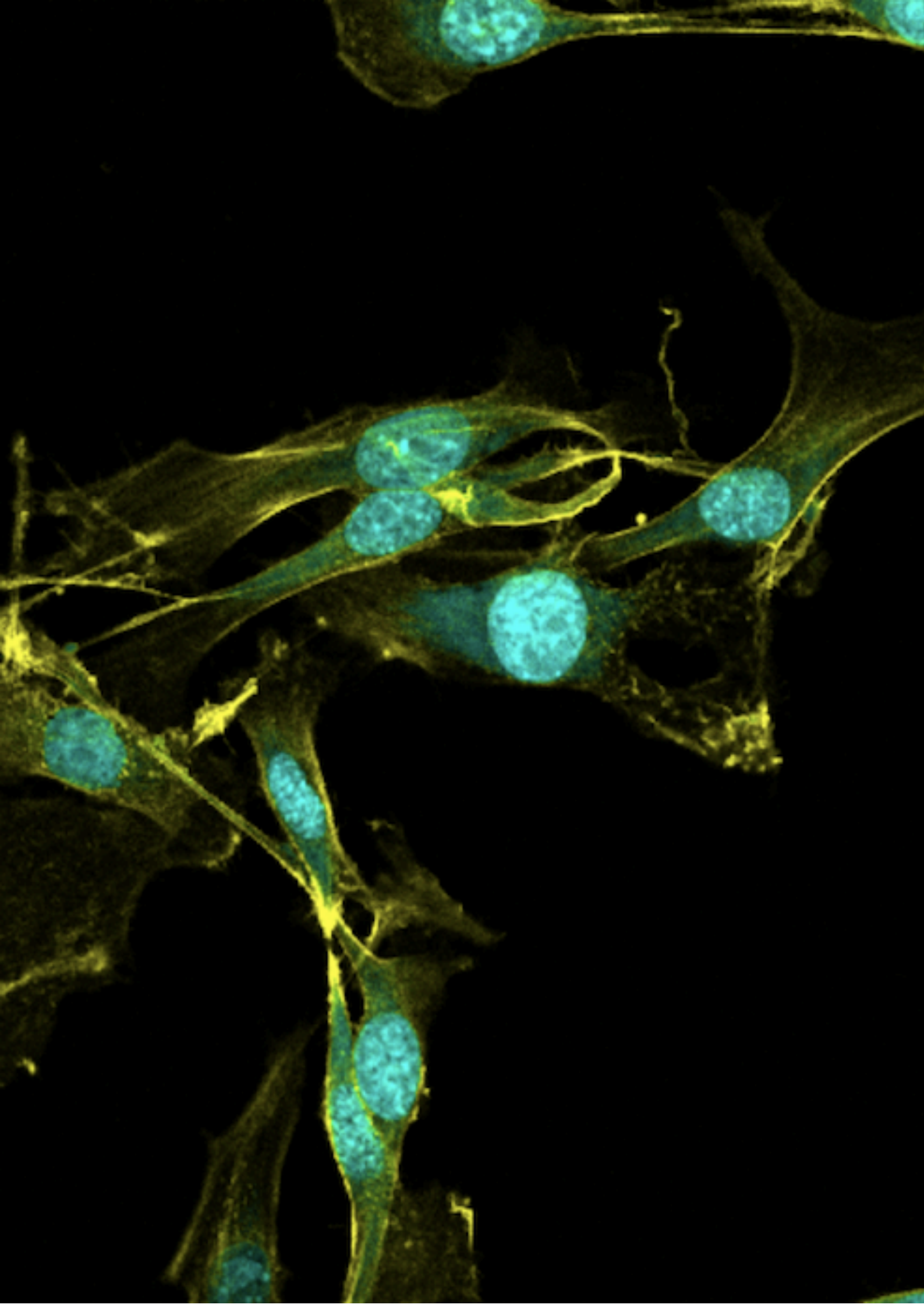


Imagen de microscopía confocal de células de melanoma B16-F10.
Marcaje de la actina (amarillo) y núcleos (cian).

10. Referencias

10. REFERENCIAS

1. International Agency for Research on Cancer. (2020).
2. Médica, S. E. de O. Las cifras del cáncer en España 2020 Hombres. (2020).
3. Instituto Nacional de Estadística (INE). Defunciones según la causa de muerte, año 2018. Pieejams: <https://www.ine.es/prensa/prensa.htm>.
4. Galceran, J. *u.c.* Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin. Transl. Oncol.* **19**, 799–825 (2017).
5. Clèries, R. *u.c.* Contribution of changes in demography and in the risk factors to the predicted pattern of cancer mortality among Spanish women by 2022. *Cancer Epidemiol.* **40**, 113–118 (2016).
6. Taniguchi, N. Current Status in, and Future Trends of, Ultraprecision Machining and Ultrafine Materials Processing. *CIRP Ann.* **32**, 573–582 (1983).
7. Maynard, A. D. Nanotechnology: The next big thing, or much ado about nothing? *Ann. Occup. Hyg.* **51**, 1–12 (2007).
8. European Commision. Environment. Chemical. Nanomaterials. Definition of a nanomaterials. (2016).
9. Roco, M. C. The long view of nanotechnology development : the National Nanotechnology Initiative at 10 years. *J. Nanoparticle Res.* **13**, 427–445 (2020).
10. Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M. & Rizzolio, F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules* **25**, (2019).
11. Alakhova, D. Y. & Kabanov, A. V. Nanomedicine and nanotechnology are rapidly developing fields across the nation and worldwide. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **208**, 1 (2015).
12. Morigi, V. *u.c.* Nanotechnology in medicine: from inception to market domination. *J. Drug Deliv.* **2012**, 389485 (2012).
13. Ventola, C. L. The nanomedicine revolution: part 1: emerging concepts. *P T* **37**, 512–525 (2012).
14. Strebhardt, K. & Ullrich, A. Paul Ehrlich ' s magic bullet concept : 100 years of progress. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 473–480 (2008).
15. Pelaz, B. *u.c.* Diverse Applications of Nanomedicine. (2017). doi:10.1021/acsnano.6b06040
16. Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A. & Danquah, M. K. Review on nanoparticles and nanostructured materials : history , sources , toxicity and regulations. *J. Nanobiotechnology* **9**, 1050–1074 (2018).
17. Cabrera-García, A. *u.c.* Engineered Contrast Agents in a Single Structure for T1-T2 Dual Magnetic Resonance Imaging. *Nanoscale* **10**, 6349–6360 (2018).
18. Kim, D. *u.c.* Multimodal Imaging of Nanocomposite Microspheres for Transcatheter Intra-Arterial Drug Delivery to Liver Tumors. *Sci. Rep.* 1–10 (2016). doi:10.1038/srep29653
19. Liu, Z. *u.c.* Long-circulating Gd2O3:Yb3+, Er3+ up-conversion nanoprobe as high-performance contrast agents for multi-modality imaging. *Biomaterials* **34**, 1712–1721 (2013).
20. Wang, C., Cheng, L. & Liu, Z. Theranostics Upconversion Nanoparticles for Photodynamic Therapy and Other Cancer Therapeutics. *Thera* **3**, (2013).
21. Chamorro-garcia, A. & Merkoc, A. Nanobiosensors in diagnostics. *Nanobiomedicine* **3**, 1–26 (2016).
22. Munawar, A., Ong, Y., Schirhagl, R. & Tahir, M. A. Nanosensors for diagnosis with optical , electric and mechanical transducers. *RSC Adv.* **9**, 6793–6803 (2019).
23. As, J. *u.c.* Efficiency of Antimicrobial Electrospun Thymol-Loaded Polycaprolactone Mats

- In Vivo'. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **3**, 3430–3439 (2020).
24. Men, W. *u.c.* Layer-by-layer pH-sensitive nanoparticles for drug delivery and controlled release with improved therapeutic efficacy in vivo. *Drug Deliv.* **27**, 180–190 (2020).
 25. Holmes, B., Castro, N. J., Li, J., Keidar, M. & Zhang, L. G. Enhanced human bone marrow mesenchymal stem cell functions in novel 3D cartilage scaffolds with hydrogen treated multi-walled carbon nanotubes. *Nanotechnology* **24**, 365102 (2013).
 26. Buckland, K. F. & Bobby Gaspar, H. Gene and cell therapy for children--new medicines, new challenges? *Adv. Drug Deliv. Rev.* **73**, 162–169 (2014).
 27. van den Tempel, N., Horsman, M. R. & Kanaar, R. Improving efficacy of hyperthermia in oncology by exploiting biological mechanisms. *Int. J. Hyperth. Off. J. Eur. Soc. Hyperthermic Oncol. North Am. Hyperth. Gr.* **32**, 446–454 (2016).
 28. Shi, J., Kantoff, P. W., Wooster, R. & Farokhzad, O. C. Cancer nanomedicine : progress , challenges and opportunities. *Nat. Publ. Gr.* **17**, 20–37 (2017).
 29. Xiao, Z. *u.c.* DNA Self-Assembly of Targeted Near-Infrared-Responsive Gold Nanoparticles for Cancer Thermo-Chemotherapy ** Angewandte. 11853–11857 (2012). doi:10.1002/anie.201204018
 30. Pace, A. *u.c.* DM1 Loaded Ultrasmall Gold Nanoparticles Display Significant Efficacy and Improved Tolerability in Murine Models of Hepatocellular Carcinoma'. *Biocon* **30**, 703–713 (2019).
 31. Lu, W. *u.c.* Targeted photothermal ablation of murine melanomas with melanocyte-stimulating hormone analog-conjugated hollow gold nanospheres. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **15**, 876–886 (2009).
 32. Meel, R. Van Der, Sulheim, E., Shi, Y., Kiessling, F. & Mulder, W. J. M. Smart cancer nanomedicine. *Nat. Nanotechnol.* **14**, 1007–1017 (2019).
 33. Cryer, A. M. & Thorley, A. J. Nanotechnology in the diagnosis and treatment of lung cancer. *Pharmacol. Ther.* **198**, 189–205 (2019).
 34. Wang, C. *u.c.* Multifunctional chitosan magnetic-graphene (CMG) nanoparticles: a theranostic platform for tumor-targeted co-delivery of drugs{,} genes and MRI contrast agents. *J. Mater. Chem. B* **1**, 4396–4405 (2013).
 35. Shen, J. *u.c.* Specific detection and simultaneously localized photothermal treatment of cancer cells using layer-by-layer assembled multifunctional nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 6443–6452 (2014).
 36. Anselmo, A. C. & Mitragotri, S. Nanoparticles in the clinic : An update. *Bioeng. Transl. Med.* **4**, 1–16 (2019).
 37. Krauss, A. C. *u.c.* FDA Approval Summary: (Daunorubicin and Cytarabine) Liposome for Injection for the Treatment of Adults with High-Risk Acute Myeloid Leukemia. *Clin. Cancer Res.* **25**, 2685–2690 (2019).
 38. Nanobiotix Press Release. Nanobiotix Announces First Ever Radio- enhancer to Receive European Market Approval. http://www.nanobiotix.com/download/news_en/2019/PR_Nanobiotix_marquage_CE_04042019_VF.pdf. (2019).
 39. Heinz, H. *u.c.* Nanoparticle decoration with surfactants: Molecular interactions, assembly, and applications. *Surf. Sci. Rep.* **72**, 1–58 (2017).
 40. de Dios, A. S. & Díaz-García, M. E. Multifunctional nanoparticles: Analytical prospects. *Anal. Chim. Acta* **666**, 1–22 (2010).
 41. Golombek, S. K. *u.c.* Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **130**, 17–38 (2018).
 42. Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N. & Farokhzad, O. C. Cancer Nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **66**, 2–25 (2015).
 43. Scherphof, G. L. & Kamps, J. A. The role of hepatocytes in the clearance of liposomes from the blood circulation. *Prog. Lipid Res.* **40**, 149–166 (2001).
 44. Dreher, M. R. *u.c.* Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. *J. Natl. Cancer Inst.* **98**, 335–344 (2006).
 45. Huo, S. *u.c.* Superior penetration and retention behavior of 50 nm gold nanoparticles in

- tumors. *Cancer Res.* **73**, 319–330 (2013).
46. Cabral, H. *u.c.* Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 815–823 (2011).
 47. Xiao, K. *u.c.* The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholeic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials* **32**, 3435–3446 (2011).
 48. Choi, K. Y. *u.c.* Smart Nanocarrier Based on PEGylated Hyaluronic Acid for Cancer Therapy. *ACS Nano* **5**, 8591–8599 (2011).
 49. Jo, H. & Ban, C. Aptamer – nanoparticle complexes as powerful diagnostic and therapeutic tools. *Exp. Mol. Pathol.* **48**, e230-9 (2016).
 50. Duo, Y. *u.c.* CX-5461-loaded nucleolus-targeting nanoplatfor for cancer therapy through induction of pro-death autophagy. *Acta Biomater.* **79**, 317–330 (2018).
 51. Yoo, J., Park, C., Yi, G., Lee, D. & Koo, H. Active Targeting Strategies Using Biological Ligands for Nanoparticle Drug Delivery Systems. *Cancers (Basel)*. **11**, 1–13 (2019).
 52. Chen, K. & Conti, P. S. Target-specific delivery of peptide-based probes for PET imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 1005–1022 (2010).
 53. Chi, L. *u.c.* Enhanced delivery of liposomes to lung tumor through targeting interleukin-4 receptor on both tumor cells and tumor endothelial cells. *J. Control. Release* **209**, 327–336 (2015).
 54. Teesalu, T., Sugahara, K. N., Kotamraju, V. R. & Ruoslahti, E. C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 16157–16162 (2009).
 55. Sugahara, K. N. *u.c.* Coadministration of a Tumor-Penetrating Peptide Enhances the Efficacy of Cancer Drugs. *Science (80-.)*. **328**, 1031 LP – 1035 (2010).
 56. Trabulo, S., Aires, A., Aicher, A., Heeschen, C. & Cortajarena, A. L. Multifunctionalized iron oxide nanoparticles for selective targeting of pancreatic cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1861**, 1597–1605 (2017).
 57. Burger, D. *u.c.* Microparticles : biomarkers and beyond. *Clin. Sci.* **124**, 423–441 (2013).
 58. Vesicles, S. C. E., Potential, N., Tool, T. & Repair, T. Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles as a Novel Potential Therapeutic Tool for Tissue Repair. *Stem Cells Transl. Med.* **0**, (2017).
 59. Eberhard G. Trams, Carl J. Lauter, Norman Salem, J. and U. H. Exfoliation of Membrane Ecto-Enzymes in the form of Micro-Vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **645**, 63–70 (1981).
 60. Théry, C., Zitvogel, L., Amigorena, S. & Roussy, I. G. Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 569–579 (2002).
 61. Xing, D., Zhu, Y., Dong, S. & Zhao, B. The State of Exosomes Research : A Global Visualized Analysis. *Biomed Res. Int.* **2019**, (2019).
 62. Yiran, W. *u.c.* Global scientific trends on exosome research during 2007-2016 : A bibliometric analysis. *Oncotarget* (2017). doi:10.18632/oncotarget.17223
 63. Van Niel, G., D'Angelo, G. & Raposo, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 213–228 (2018).
 64. To, L. & Editor, T. H. E. Double-stranded DNA in exosomes : a novel biomarker in cancer detection. **24**, 766–769 (2014).
 65. Staubach, S., Razawi, H. & Hanisch, F.-G. Proteomics of MUC1-containing lipid rafts from plasma membranes and exosomes of human breast carcinoma cells MCF-7. *Proteomics* **9**, 2820–2835 (2009).
 66. Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 255–289 (2014).
 67. Raposo, G. & Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* **200**, 373–383 (2013).
 68. Yáñez-Mó, M. *u.c.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles* **1**, 1–60 (2015).
 69. Rajagopal, C. & Harikumar, K. B. The Origin and Functions of Exosomes in Cancer. *Front. Oncol.* **8**, 1–13 (2018).

70. Tamkovich, S. N., Tutanov, O. S. & Laktionov, P. P. Exosomes: Generation, structure, transport, biological activity, and diagnostic application. *Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* **10**, 163–173 (2016).
71. Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 255–289 (2014).
72. Tetta, C., Ghigo, E. & Silengo, L. Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication. *Endocrine* **44**, 11–19 (2013).
73. Niel, G. Van, Porto-carreiro, I. & Simoes, S. Exosomes : A Common Pathway for a Specialized Function. *J. Biochem.* **140**, 13–21 (2006).
74. Melia, T. J. Putting the clamps on membrane fusion: How complexin sets the stage for calcium-mediated exocytosis. *FEBS Lett.* **581**, 2131–2139 (2007).
75. Zhou, X. *u.c.* The function and clinical application of extracellular vesicles in innate immune regulation. *Cell. Mol. Immunol.* (2020). doi:10.1038/s41423-020-0391-1
76. Ni, Z. *u.c.* Exosomes : roles and therapeutic potential in osteoarthritis. *Bone Res.* (2020). doi:10.1038/s41413-020-0100-9
77. Cossetti, C. *u.c.* Extracellular vesicles from neural stem cells transfer IFN- γ via Ifngr1 to activate Stat1 signaling in target cells. *Mol. Cell* **56**, 193–204 (2014).
78. Svensson, K. J. *u.c.* Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *J. Biol. Chem.* **288**, 17713–17724 (2013).
79. Mulcahy, L. A., Pink, R. C., Raul, D. & Carter, F. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J. Extracell. Vesicles* **1**, 1–14 (2014).
80. French, K. C., Antonyak, M. A. & Cerione, R. A. Extracellular vesicle docking at the cellular port: Extracellular vesicle binding and uptake. *Semin. Cell Dev. Biol.* **67**, 48–55 (2017).
81. Valadi, H. *u.c.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **9**, 654–659 (2007).
82. Crenshaw, B. J., Gu, L., Sims, B. & Matthews, Q. L. Exosome Biogenesis and Biological Function in Response to Viral Infections. *Open Virol. J.* **12**, 134–148 (2018).
83. Kobayashi, M., Rice, G. E., Tapia, J., Mitchell, M. D. & Salomon, C. Exosomes are fingerprints of originating cells : potential biomarkers for ovarian cancer. *Res. Reports Biochem.* **5**, 101–109 (2015).
84. György, B. *u.c.* Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 2667–2688 (2011).
85. Keller, S., Sanderson, M. P., Stoeck, A. & Altevogt, P. Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function. *Immunol. Lett.* **107**, 102–108 (2006).
86. Schorey, J. S. & Bhatnagar, S. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic* **9**, 871–881 (2008).
87. Kalluri, R. & LeBleu, V. S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science (80-.)*. **367**, (2020).
88. Boukouris, S. & Mathivanan, S. Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers. *Proteomics Clin. Appl.* **9**, 358–367 (2015).
89. Kosaka, N. *u.c.* Dark side of the exosome: the role of the exosome in cancer metastasis and targeting the exosome as a strategy for cancer therapy. *Future Oncol.* **10**, 671–81 (2014).
90. Ohshima, K., Inoue, K., Fujiwara, A., Hatakeyama, K. & Kanto, K. Let-7 MicroRNA Family Is Selectively Secreted into the Extracellular Environment via Exosomes in a Metastatic Gastric Cancer Cell Line. *PLoS One* **5**, 1–10 (2010).
91. Whiteside, T. L. Exosome and mesenchymal stem cell cross-talk in the tumor microenvironment. *Semin. Immunol.* **35**, 69–79 (2018).
92. Kahlert, C. & Kalluri, R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J. Mol. Med.* **91**, 431–437 (2013).
93. Wang, S. *u.c.* Exosomes released by hepatocarcinoma cells endow adipocytes with

- tumor-promoting properties. *J. Hematol. Oncol.* **11**, 1–14 (2018).
94. Zebrowska, A., Widlak, P. & Whiteside, T. Signaling of Tumor-Derived sEV Impacts Melanoma Progression. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–21 (2020).
 95. Jiang, X., Hu, S., Liu, Q., Qian, C. & Liu, Z. Exosomal microRNA remodels the tumor microenvironment. *Peer J* 1–24 (2017). doi:10.7717/peerj.4196
 96. He, M. & Zeng, Y. Microfluidic Exosome Analysis toward Liquid Biopsy for Cancer. *J. Lab. Autom.* **21**, 599–608 (2016).
 97. Javeed, N. & Mukhopadhyay, D. Exosomes and their role in the micro- / macro-environment : a comprehensive review. *J. Biomed. Res.* **31**, 386–394 (2017).
 98. Barile, L. & Vassalli, G. Exosomes : Therapy delivery tools and biomarkers of diseases. *Pharmacol. Ther.* **174**, 63–78 (2017).
 99. Ferguson, S. W. & Nguyen, J. Exosomes as therapeutics: The implications of molecular composition and exosomal heterogeneity. *J. Control. Release* **228**, 179–190 (2016).
 100. Sokolova, V. *u.c.* Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **87**, 146–150 (2011).
 101. Kalra, H. *u.c.* Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. *Proteomics* **13**, 3354–3364 (2013).
 102. Zhuang, X. *u.c.* Treatment of Brain Inflammatory Diseases by Delivering Exosome Encapsulated Anti-inflammatory Drugs From the Nasal Region to the Brain. *Mol. Ther.* **19**, 1769–1779 (2009).
 103. Batrakova, E. V. & Kim, M. S. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *J. Control. Release* **219**, 396–405 (2015).
 104. Munagala, R., Aqil, F., Jeyabalan, J. & Gupta, R. C. Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer Lett.* **371**, 48–61 (2016).
 105. Haney, M. J. *u.c.* Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *J. Control. release* **207**, 18–30 (2015).
 106. Alvarez-erviti, L. *u.c.* Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Bio* **29**, 341–347 (2011).
 107. Batrakova, E. V, Kim, M. S. & Hill, C. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *J. Control. Release* **219**, 396–405 (2016).
 108. Sun, B., Dalvi, P., Abadjian, L., Tang, N. & Pulliam, L. Blood neuron-derived exosomes as biomarkers of cognitive impairment in HIV. *AIDS* **31**, F9–F17 (2017).
 109. Zhang, W., Ou, X. & Wu, X. Proteomics profiling of plasma exosomes in epithelial ovarian cancer: A potential role in the coagulation cascade, diagnosis and prognosis. *Int. J. Oncol.* **54**, 1719–1733 (2019).
 110. Lai, C. P. *u.c.* Dynamic Biodistribution of Extracellular Vesicles in Vivo Using a Multimodal Imaging Reporter. *ACS Nano* **8**, 483–494 (2014).
 111. Sancho-Albero, M., Medel-Martinez, A. & Martín-Duque, P. Use of exosomes as vectors to carry advanced therapies. *RSC Adv.* **10**, 23975–23987 (2020).
 112. Yang, B., Chen, Y. & Shi, J. Exosome Biochemistry and Advanced Nanotechnology for Next-Generation Theranostic Platforms. *Adv. Mater.* **31**, 1–33 (2019).
 113. Alhasan, A. H., Patel, P. C., Choi, C. H. J. & Mirkin, C. A. Exosome Encased Spherical Nucleic Acid Gold Nanoparticle Conjugates As Potent MicroRNA Regulation Agents. *Small* **6**, 247–253 (2009).
 114. Hood, J. L., Scott, M. J. & Wickline, S. A. Maximizing exosome colloidal stability following electroporation. *Anal. Biochem.* **448**, 41–49 (2014).
 115. Hu, L., Wickline, S. A. & Hood, J. L. Magnetic Resonance Imaging of Melanoma Exosomes in Lymph Nodes. *Magn. Reson. Med.* **74**, 266–271 (2015).
 116. Altanerova, U. *u.c.* Human mesenchymal stem cell-derived iron oxide exosomes allow targeted ablation of tumor cells via magnetic hyperthermia. *Int. J. Nanomedicine* **12**, 7923–7936 (2017).
 117. Busato, A. *u.c.* Labeling and magnetic resonance imaging of exosomes isolated from

- adipose stem cells. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **75**, 3.44.1-3.44.15 (2017).
118. Neubert, J. & Glumm, J. Promoting neuronal regeneration using extracellular vesicles loaded with superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Neural Regen. Res.* **11**, 61–63 (2016).
 119. Silva, A. K. A. *u.c.* Combining magnetic nanoparticles with cell derived microvesicles for drug loading and targeting. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **11**, 645–655 (2015).
 120. Hood, J. L., Scott, M. J. & Wicklinesaolcom, S. A. W. Maximizing Exosome Colloidal Stability Following Electroporation. *Anal Biochem* 41–49 (2015).
 121. Hu, L., Wickline, S. A. & Hood, J. L. Magnetic Resonance Imaging of Melanoma Exosomes in Lymph Nodes. *Anal Chem.* **25**, 368–379 (2015).
 122. Jia, G. *u.c.* NRP-1 targeted and cargo-loaded exosomes facilitate simultaneous imaging and therapy of glioma in vitro and in vivo. **178**, 302–316 (2018).
 123. Betzer, O. *u.c.* In Vivo Neuroimaging of Exosomes Using Gold. *ACS Nano* **11**, 10883–10893 (2017).
 124. Roma-rodrigues, C. *u.c.* Tumor Microenvironment Modulation via Gold Nanoparticles Targeting Malicious Exosomes : Implications for Cancer Diagnostics and Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
 125. Lara, P. *u.c.* Gold nanoparticle based double - labeling of melanoma extracellular vesicles to determine the specificity of uptake by cells and preferential accumulation in small metastatic lung tumors. *J. Nanobiotechnology* **18**, 1–17 (2020).
 126. Alvarez-Erviti, L. *u.c.* Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* **29**, 341–345 (2011).
 127. Illes, B. *u.c.* Exosome-Coated Metal–Organic Framework Nanoparticles: An Efficient Drug Delivery Platform. *Chem. Mater.* **29**, 8042–8046 (2017).
 128. Zhu, M. *u.c.* Nanoparticle-Induced Exosomes Target Antigen-Presenting Cells to Initiate Th1-Type Immune Activation. *Small* **8**, 2841–2848 (2012).
 129. Tian, X. *u.c.* A membrane vesicle-based dual vaccine against melanoma and Lewis lung carcinoma. *Biomaterials* **33**, 6147–6154 (2012).
 130. Amendola, V., Pilot, R. & Frascioni, M. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles : a review. *J. Phys. Condens. Matter* **29**, 1–48 (2017).
 131. Patra, J. K. *u.c.* Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J. Nanobiotechnology* **16**, 1–33 (2018).
 132. Min, Y., Caster, J. M., Eblan, M. J. & Wang, A. Z. Clinical translation of nanomedicine. *Chem. Rev.* **115**, 11147–11190 (2015).
 133. Kalani, A., Tyagi, A. & Tyagi, N. Exosomes: Mediators of Neurodegeneration, Neuroprotection and Therapeutics. **19**, 389–399 (2009).
 134. Sun, D. *u.c.* A novel nanoparticle drug delivery system: The anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Mol. Ther.* **18**, 1606–1614 (2010).
 135. Haney, M. J. *u.c.* Exosomes as Drug Delivery Vehicles for Parkinson's Disease Therapy. *J. Control. Release* **21**, 4062–4072 (2016).
 136. Ohno, S. I. *u.c.* Systemically Injected Exosomes Targeted to EGFR Deliver Antitumor MicroRNA to Breast Cancer Cells. *Mol. Ther.* **21**, 185–191 (2013).
 137. Tian, Y. *u.c.* A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials* **35**, 2383–2390 (2014).
 138. Yang, T. *u.c.* Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in Danio Rerio. *Pharm Res.* **32**, 2003–2014 (2015).
 139. Chem, J. M., Lesieur, S., Gazeau, F., Luciani, N. & Christine, M. Multifunctional nanovectors based on magnetic nanoparticles coupled with biological vesicles or synthetic liposomes. 14387–14393 (2011). doi:10.1039/c1jm10487j
 140. Qi, H. *u.c.* Blood Exosomes Endowed with Magnetic and Targeting Properties for Cancer Therapy. *ACS Nano* **10**, 3323–3333 (2016).
 141. Khongkow, M., Yata, T. & Boonrungsiman, S. Surface modification of gold nanoparticles

- with neuron-targeted exosome for enhanced blood – brain barrier penetration. *Sci. Rep.* **9**, 1–9 (2019).
142. Betzer, O. *u.c.* In Vivo Neuroimaging of Exosomes Using Gold Nanoparticles. *ACS Nano* **11**, 10883–10893 (2017).
 143. Roma-rodrigues, C. *u.c.* Smuggling gold nanoparticles across cell types – A new role for exosomes in gene silencing. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **13**, 1389–1398 (2017).
 144. Miller, R. D. *u.c.* Water soluble, biodegradable amphiphilic polymeric nanoparticles and the molecular environment of hydrophobic encapsulates: Consistency between simulation and experiment. *Polymer (Guildf)*. **79**, 255–261 (2015).
 145. Narayanan, N. K., Nargi, D., Randolph, C. & Narayanan, B. A. Liposome encapsulation of curcumin and resveratrol in combination reduces prostate cancer incidence in PTEN knockout mice. *Int. J. Cancer* **125**, 1–8 (2009).
 146. Cui, J. *u.c.* Enhancement of oral absorption of curcumin by self-microemulsifying drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* **371**, 148–155 (2009).
 147. Bunggulawa, E. J. *u.c.* Recent advancements in the use of exosomes as drug delivery systems. *J. Nanobiotechnology* 1–13 (2018). doi:10.1186/s12951-018-0403-9
 148. Ha, D., Yang, N. & Nadithe, V. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharm. Sin. B* **6**, 287–296 (2016).
 149. Fuhrmann, G., Serio, A., Mazo, M., Nair, R. & Stevens, M. M. Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins. *J. Control. Release* **205**, 35–44 (2015).
 150. Tirotta, I. *u.c.* A Superfluorinated Molecular Probe for Highly Sensitive in Vivo ¹⁹F-MRI. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 8524–8527 (2014).
 151. Chem, J. M. *u.c.* Highly reproducible synthesis of hollow gold nanospheres with near infrared surface plasmon absorption using PVP as stabilizing agent. *J. Mater. Chem.* **21**, 2344–2350 (2011).
 152. Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J. & Whyman, R. Synthesis of Thiol-derivatised Gold Nanoparticles in a Two-phase Liquid-Liquid System. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 801–802 (2000).
 153. Moros, M., Pelaz, B., Pilar, L., Garc, M. L. & Graz, V. Engineering biofunctional magnetic nanoparticles for biotechnological applications. *Nanoscale* **2**, 1746–1755 (2010).
 154. Wassler, M., Jonasson, I., Persson, R. & Fries, E. Differential permeabilization of membranes by saponin treatment of isolated rat hepatocytes Release of secretory proteins. **247**, 407–415 (1987).
 155. Gammoudi I., Mathelié-Guinlet M., Moroté F., Grauby-Heywang C., Moynet D., C.-B. T. *LS-1-P-2776 Interaction of Escherichia coli bacteria with silica nanoparticles studied by Atomic Force Microscopy.*
 156. Encabo-Berzosa, M. *u.c.* The effect of PEGylated hollow gold nanoparticles on stem cell migration : potential application in tissue regeneration. *Nanoscale* **9**, 9848–9858 (2017).
 157. Thakur, B. K. *u.c.* Double-stranded DNA in exosomes: A novel biomarker in cancer detection. *Cell Res.* **24**, 766–769 (2014).
 158. Datta, A. *u.c.* Manumycin A suppresses exosome biogenesis and secretion via targeted inhibition of Ras / Raf / ERK1 / 2 signaling and hnRNP H1 in castration-resistant prostate cancer cells. *Cancer Lett.* **408**, 73–81 (2017).
 159. Ostrowski, M. *u.c.* Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.* **12**, 19–30 (2009).
 160. Goodman AM, Cao Y, Urban C, Neumann O, Ayala-Orozco C, Knight MW, J. A. & Nordlander P, H. N. The surprising in vivo instability of near-IR-absorbing hollow Au-Ag nanoshells. *ACS Nano* **8**, 3222–3231 (2014).
 161. Bardi, G. T., Smith, M. A. & Hood, J. L. Melanoma exosomes promote mixed M1 and M2 macrophage polarization. *Cytokine* **105**, 63–72 (2018).
 162. Hood, J. L., San Roman, S. & Wickline, S. A. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res.* **71**, 3792–3801 (2011).

163. Akagi, T., Kato, K., Hanamura, N., Kobayashi, M. & Ichiki, T. Evaluation of desialylation effect on zeta potential of extracellular vesicles secreted from human prostate cancer cells by on-chip microcapillary electrophoresis. *Japanese J. Appl. Physocs* **53**, 1–4 (2014).
164. Théry, C. *u.c.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles* **7**, (2018).
165. Mazzucchelli, D. G. *u.c.* Pores Formation on Cell Membranes by Hederacolchiside A1 Leads to a Rapid Release of Proteins for Cytosolic Subproteome Analysis. *J. Proteome Res.* **7**, 1683–1692 (2008).
166. Podolak, I., Galanty, A. & Sobolewska, D. Saponins as cytotoxic agents: A review. *Phytochem. Rev.* **9**, 425–474 (2010).
167. Kim, M. S. *u.c.* Development of Exosome-encapsulated Paclitaxel to Overcome MDR in Cancer cells. *Nanomedicine* **12**, 655–664 (2016).
168. Luan, X. *u.c.* Engineering exosomes as refined biological nanoplatfroms for drug delivery. *Acta Pharmacol. Sin.* **38**, 754–763 (2017).
169. Khuri-yakub, B. T., Maduke, M. C. & Prieto, M. L. Dynamic Response of Model Lipid Membranes to Ultrasonic Radiation Force. **8**, (2013).
170. Alvarez-Erviti, L. *u.c.* Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* **29**, 3–4 (2011).
171. Díaz, B. *u.c.* Assessing Methods for Blood Cell Cytotoxic Responses to Inorganic Nanoparticles and Nanoparticle Aggregates. *Small* **4**, 2025–2034 (2008).
172. Encabo-berzosa, M. M. *u.c.* Selective delivery of photothermal nanoparticles to tumors using mesenchymal stem cells as Trojan horses †. *RSC Adv.* **6**, 58723–58732 (2016).
173. Sancho-albero, M., Navascués, N., Mendoza, G., Sebastián, V. & Arruebo, M. Exosome origin determines cell targeting and the transfer of therapeutic nanoparticles towards target cells. *J. Nanobiotechnology* **17**, 1–13 (2019).
174. Tan, J. *u.c.* Surface Modification of Cisplatin-complexed Gold Nanoparticles and its Influence on Colloidal Stability , Drug Loading and Release. **34**, 154–163 (2018).
175. Hinde, E. *u.c.* Pair correlation microscopy reveals the role of nanoparticle shape in intracellular transport and site of drug release. *Nat. Nanotechnol.* **12**, 81–89 (2017).
176. Cheang, T., Xu, J., Wang, M. & Wang, S. Promising plasmid DNA vector based on APTES- modified silica nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **7**, 1061–1067 (2012).
177. Srivastava, A. *u.c.* Nanosomes carrying doxorubicin exhibit potent anticancer activity against human lung cancer cells. *Nat. Publ. Gr.* 1–15 (2016). doi:10.1038/srep38541
178. Sancho-Albero, M. *u.c.* Efficient encapsulation of theranostic nanoparticles in cell-derived exosomes: Leveraging the exosomal biogenesis pathway to obtain hollow gold nanoparticle-hybrids. *Nanoscale* 18825–18836 (2019). doi:10.1039/c9nr06183e
179. Sancho-Albero, M., Navascués, N., Mendoza, G., Sebastián, V. & Arruebo, M. Exosome origin determines cell targeting and the transfer of therapeutic nanoparticles towards target cells. *J. Nanobiotechnology* **17**, 1–13 (2019).
180. Sancho-albero, M. *u.c.* Cancer-derived exosomes loaded with ultrathin palladium nanosheets for targeted bioorthogonal catalysis. *Nat. Catal.* 864–872 (2019). doi:10.1038/s41929-019-0333-4
181. Costa Verdera, H., Gitz-Francois, J. J., Schiffelers, R. M. & Vader, P. Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *J. Control. Release* **266**, 100–108 (2017).
182. Gratton, S. E. A. *u.c.* The effect of particle design on cellular internalization pathways. *PNAS* **105**, (2008).
183. Kuhn, D. A. *u.c.* Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages. *J. Nanotechnol.* 1625–1636 (2014).
184. Komaki, M. *u.c.* Exosomes of human placenta-derived mesenchymal stem cells stimulate angiogenesis. 1–12 (2017). doi:10.1186/s13287-017-0660-9
185. Wan, R. *u.c.* DNA Damage Caused by Metal Nanoparticles: Involvement of Oxidative Stress and Activation of ATM. *Chem. Res. Toxicol.* **25**, 1402–1411 (2012).

186. Mackey, M. A. & El-Sayed, M. A. Chemosensitization of Cancer Cells via Gold Nanoparticle-Induced Cell Cycle Regulation. *Photochem. Photobiol.* **90**, 306–312 (2014).
187. Alkilany, A. M. & Murphy, C. J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles : what we have learned so far ? *J. Nanoparticle Res.* **12**, 2313–2333 (2010).
188. Chithrani, B. D., Ghazani, A. A. & Chan C.W., W. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Lett.* **6**, 662–668 (2006).
189. Rejman, J. *u.c.* Some thoughts about the intracellular location of nanoparticles and the resulting consequences. *J. Colloid Interface Sci.* **482**, 260–266 (2016).
190. Wong, A. C. & Wright, D. W. Size-Dependent Cellular Uptake of DNA Functionalized Gold Nanoparticles. *Small* **12**, 5592–5600 (2016).
191. Delenclos, M. *u.c.* Investigation of Endocytic Pathways for the Internalization of Exosome-Associated Oligomeric Alpha-Synuclein. *Front. Neurosci.* **11**, 172 (2017).
192. Hessvik, N. P. & Llorente, A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 193–208 (2018).
193. Bartneck, M., Keul, H. A. & Zwadlo-klarwasser, G. Nanoparticle Clearance by Human Immune. *Nano Lett.* 59–63 (2010). doi:10.1021/nl902830x
194. Dichiarante, V., Milani, R. & Metrangolo, P. Natural surfactants towards a more sustainable fluorine chemistry. *Green Chem.* **20**, 13–27 (2018).
195. Tirotta, I. *u.c.* 19F Magnetic Resonance Imaging (MRI): From Design of Materials to Clinical Applications. *Chem. Rev.* **115**, 1106–1129 (2015).
196. Singh, Y. *u.c.* Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J. Control. Release* **252**, 28–49 (2017).
197. Zeta, V., Soybean, C., Water, G. & Kabi, F. Physicochemical properties of lecithin-based nanoemulsions obtained by spontaneous emulsification or high-pressure homogenization. *Quim. Nov.* **37**, 1193–1198 (2014).
198. Verheijen, M. *u.c.* DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Sci. Rep.* **9**, 4641 (2019).
199. Yi, X. *u.c.* Toxic effects of dimethyl sulfoxide on red blood cells, platelets, and vascular endothelial cells in vitro. *FEBS Open Bio* **7**, 485–494 (2017).
200. Levy, E. S., Morales, D. P., Garcia, J. V, Reich, N. O. & Ford, P. C. Near-IR mediated intracellular uncaging of NO from cell targeted hollow gold nanoparticles †. *Chem. Commun.* **1**, 17692–17695 (2015).
201. Chirizzi, C., Battista, D. De, Tirotta, I. & Metrangolo, P. Multispectral MRI with Dual Fluorinated Probes to Track Mononuclear Cell Activity in Mice. *Radiology* **291**, 351–357 (2019).
202. Xie, X., Liao, J., Shao, X., Li, Q. & Lin, Y. The Effect of shape on Cellular Uptake of Gold Nanoparticles in the forms of Stars , Rods , and Triangles. *Sci. Rep.* **7**, 1–9 (2017).
203. Zhang, D. *u.c.* Chemical Science The morphology and surface charge-dependent nanostructures revealed by single-particle optical. *Chem. Sci.* **9**, 5260–5269 (2018).
204. Sun, X., Gan, Q. & Ouyang, J. Size-dependent cellular uptake mechanism and cytotoxicity toward calcium oxalate on Vero cells. *Nat. Publ. Gr.* **7**, 1–12 (2017).
205. Cell, C. *u.c.* CXCL5 Modified Nanoparticle Surface Improves CXCR2 + Cell Selective Internalization. *Cells* **9**, 1–11 (2019).
206. Arana, L. *u.c.* Solid Lipid Nanoparticles Surface Modification Modulates Cell Internalization and Improves Chemotoxic Treatment in an Oral Carcinoma Cell Line. *Nanomaterials* **9**, 1–17 (2019).
207. Xia, Y., Xiong, Y., Lim, B. & Skrabalak, S. E. Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanocrystals: Simple Chemistry Meets Complex Physics? *Angew. Chemie Int. Ed.* **48**, 60–103 (2009).
208. Chen, M., Wu, B., Yang, J. & Zheng, N. Small Adsorbate-Assisted Shape Control of Pd and Pt Nanocrystals. *Adv. Mater.* **24**, 862–879 (2012).
209. Young, J. K. *u.c.* Size-controlled synthesis of monodispersed gold nanoparticles via carbon monoxide gas reduction. *Nano Res. Lett.* **6**, 1–11 (2011).

210. Jang, H. D. *u.c.* Preparation of cobalt nanoparticles by hydrogen reduction of cobalt chloride in the gas phase. *Mater. Res. Bull.* **39**, 63–70 (2004).
211. Wu, B., Zheng, N. & Fu, G. Small molecules control the formation of Pt nanocrystals: a key role of carbon monoxide in the synthesis of Pt nanocubes. *Chem. Commun.* **47**, 1039–1041 (2011).
212. Huang, H. *u.c.* Rapid synthesis of gold nanoparticles with carbon monoxide in a microfluidic segmented flow system. *React. Chem. Eng.* **4**, 884–890 (2019).
213. Wu, J., Gross, A. & Yang, H. Shape and Composition-Controlled Platinum Alloy Nanocrystals Using Carbon Monoxide as Reducing Agent. *Nano Lett.* **11**, 798–802 (2011).
214. Yang, N. J. & Hinner, M. J. Getting Across the Cell Membrane: An Overview for Small Molecules, Peptides, and Proteins. *Methods Mol Biol* **1266**, 29–53 (2015).
215. Ponisovskiy, M. R. Driving mechanisms of passive and active transport across cellular membranes as the mechanisms of cell metabolism and development as well as the mechanisms of cellular distance reactions on hormonal expression and the immune response. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **21**, 267–290 (2011).
216. Goodman, B. E. TRANSPORT OF SMALL MOLECULES ACROSS CELL MEMBRANES : WATER CHANNELS AND UREA TRANSPORTERS. *Adv. Physiol. Educ.* **26**, 146–157 (2020).
217. Missner, A., Horner, A. & Pohl, P. Cholesterol ' s decoupling effect on membrane partitioning and permeability revisited : Is there anything beyond Fick ' s law of diffusion ? *Biochem Biophys Acta* **1778**, 2154–2156 (2011).
218. Huzar, T. F., George, T. & Cross, J. M. Carbon monoxide and cyanide toxicity: etiology, pathophysiology and treatment in inhalation injury. *Expert Rev. Respir. Med.* **7**, 159–170 (2013).
219. Hill, A. V. The Combinations of Haemoglobin with Oxygen and with Carbon Monoxide. *Biochem. J.* **7**, 471–480 (1913).
220. Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (INSST), O.A., M. P. *Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España. 2019.* (2019).
221. Sebastian, V., Smith, C. D. & Jensen, K. F. Shape-controlled continuous synthesis of metal nanostructures. 7534–7543 (2016). doi:10.1039/c5nr08531d
222. Herrer, L. *u.c.* Nanoscale monolayer by in situ synthesis of palladium nanodeposits. 13281–13290 (2017). doi:10.1039/c7nr03365f
223. Özer, M. M., Jia, Y., Zhang, Z., Thompson, J. R. & Weitering, H. H. Tuning the Quantum Stability and Superconductivity of Ultrathin Metal Alloys. *Science (80-.)*. **316**, 1594 LP – 1597 (2007).
224. Guo, Y. *u.c.* Superconductivity Modulated by Quantum Size Effects. *Science (80-.)*. **306**, 1915 LP – 1917 (2004).
225. Smith, A. R., Chao, K.-J., Niu, Q. & Shih, C.-K. Formation of atomically flat silver films on GaAs "silver mean" wuasi periodicity. *Science (80-.)*. **273**, 226 LP – 228 (1996).
226. Huang, X. *u.c.* Freestanding palladium nanosheets with plasmonic and catalytic properties. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 28 (2010).
227. Schlotterbeck, U. *u.c.* Shape-Selective Synthesis of Palladium Nanoparticles Stabilized by Highly Branched Amphiphilic Polymers. *Adv. Funct. Mater.* **14**, 999–1004 (2004).
228. Siril, P. F. *u.c.* Synthesis of Ultrathin Hexagonal Palladium Nanosheets. *Chem. Mater.* **21**, 5170–5175 (2009).
229. Cooper, J. R. *u.c.* Long Term Culture of the A549 Cancer Cell Line Promotes Multilamellar Body Formation and Differentiation towards an Alveolar Type II Pneumocyte Phenotype. *PLoS One* **11**, e0164438 (2016).
230. Lieber, M., Todaro, G., Smith, B., Szakal, A. & Nelson-Rees, W. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer* **17**, 62–70 (1976).
231. Foster, K. A., Oster, C. G., Mayer, M. M., Avery, M. L. & Audus, K. L. Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism. *Exp. Cell Res.* **243**, 359–366 (1998).

232. Lourthuraj, A. A., M, M. S. & Ravikrishnan, B. Analyses of Antiproliferative Property of Cleistanthin-A against A549 Cell Line. *Biomed. Pharmacol. J.* **10**, 255–259 (2017).
233. Lee, P. J., Alam, J., Wiegand, G. W. & Choi, A. M. Overexpression of heme oxygenase-1 in human pulmonary epithelial cells results in cell growth arrest and increased resistance to hyperoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 10393 LP – 10398 (1996).
234. Zhang, D. *u.c.* An In situ TEM study of the surface oxidation of palladium nanocrystals assisted by electron irradiation. *Nanoscale* **9**, 6327–6333 (2017).
235. Huang, F. *u.c.* Palladium nanoclusters immobilized on defective nanodiamond-graphene core-shell supports for semihydrogenation of phenylacetylene. *J. Energy Chem.* **33**, 31–36 (2019).
236. Fontes, E. H. *u.c.* Structural analysis of PdRh/C and PdSn/C and its use as electrocatalysts for ethanol oxidation in alkaline medium. *Int. J. Hydrogen Energy* **44**, 937–951 (2019).
237. Elhage, A. & Scaiano, J. C. Catalytic farming: reaction rotation extends catalyst performance. *Chem. Sci.* **10**, 1419–1425 (2019).
238. Willms, E. *u.c.* Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Nat. Publ. Gr.* **6**, 1–12 (2016).
239. Kowal, J. *u.c.* Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *PNAS* **113**, E968–E977 (2016).
240. Kikot, P., Polat, A., Achilli, E., Fernandez Lahore, M. & Grasselli, M. Immobilized palladium(II) ion affinity chromatography for recovery of recombinant proteins with peptide tags containing histidine and cysteine. *J. Mol. Recognit.* **27**, 659–668 (2014).
241. Duff, D. G., Baiker, A. & Edwards, P. P. A new hydrosol of gold clusters. 1. Formation and particle size variation. *Langmuir* **9**, 2301–2309 (1993).
242. Hu, J., Wang, Z. & Li, J. Gold Nanoparticles With Special Shapes: Controlled Synthesis, Surface-enhanced Raman Scattering, and The Application in Biodetection. *Sensors* **7**, 3299–3311 (2007).
243. Polte, J. *u.c.* Nucleation and Growth of Gold Nanoparticles Studied via in situ Small Angle X-ray Scattering at Millisecond Time Resolution. *ACS Nano* **4**, 1076–1082 (2010).
244. NR, J., L, G. & CJ, M. Seeding growth for size control of 5-40 nm diameter gold nanoparticles. *Langmuir* **17**, 6782–6786 (2001).
245. Turkevich, J., Stevenson, P. C. & Hillier, J. The Formation of Colloidal Gold. *J. Phys. Chem.* **57**, 670–673 (1953).
246. Park, S.-E., Park, M.-Y., Han, P.-K. & Lee, S.-W. The effect of pH-adjusted gold colloids on the formation of gold clusters over APTMS-coated silica cores. *Bull Korean Chem Soc* **27**, 1341 (2006).
247. Sakai, T. & Alexandridis, P. Size- and shape-controlled synthesis of colloidal gold through autoreduction of the auric cation by poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide) block copolymers in aqueous solutions at ambient conditions. *Nanotechnology* **16**, S344–S353 (2005).
248. Leifert, A., Pan-Bartnek, Y., Simon, U. & Jahnke-Dechent, W. Molecularly stabilised ultrasmall gold nanoparticles: synthesis, characterization and bioactivity. *Nanoscale* **5**, 6224–6242 (2013).
249. Encabo-Berzosa, M. M. *u.c.* Polymer functionalized gold nanoparticles as nonviral gene delivery reagents. *J. Gene Med.* **19**, e2964 (2017).
250. Boukouris, S. & Mathivanan, S. Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers. *Proteomics Clin. Appl.* **9**, 358–367 (2017).
251. Keller, S., Ridinger, J., Rupp, A. K., Janssen, J. W. G. & Altevogt, P. Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. *J. Transl. Med.* **9**, 2–9 (2011).
252. Cappello, F. *u.c.* Exosome levels in human body fluids: A tumor marker by themselves? *Eur. J. Pharm. Sci.* **96**, 93–98 (2017).
253. Xiao, T. *u.c.* The role of exosomes in the pathogenesis of Alzheimer ' disease. *Transl. Neurodegener.* **6**, 1–6 (2017).
254. Lin, J. *u.c.* Exosomes : Novel Biomarkers for Clinical Diagnosis. **2015**, 1–8 (2015).

255. Toro, J. De, Herschlik, L., Waldner, C. & Mongini, C. Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions : new insights for diagnosis and therapeutic applications. *Front. Immunol.* **6**, 1–12 (2015).
256. Rana, S., Yue, S., Stadel, D. & Zöller, M. Toward tailored exosomes: The exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 1574–1584 (2012).
257. Hazan-Halevy, I. *u.c.* Cell-specific uptake of mantle cell lymphoma-derived exosomes by malignant and non-malignant B-lymphocytes. *Cancer Lett.* **364**, 59–69 (2015).
258. Toda, Y. *u.c.* Effective internalization of U251-MG-secreted exosomes into cancer cells and characterization of their lipid components. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **456**, 768–773 (2015).
259. Betzer, O. *u.c.* Advances in imaging strategies for in vivo tracking of exosomes. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* **12**, e1594 (2020).
260. Chuo, S. T., Chien, J. C. & Lai, C. P. Imaging extracellular vesicles : current and emerging methods. *J. Biomed. Sci.* **5**, 1–10 (2018).
261. Jing, B., Qian, R., Gai, Y., Lan, X. & An, R. Multimodality PET/CT and NIRF imaging for Image-Guided Surgery of Colon Cancer with Exosomes Based Nanoprobe. *J. Nucl. Med.* **60**, 662 (2019).
262. Keustermans, G. C. E., Hoeks, S. B. E., Meerding, J. M., Prakken, B. J. & Jager, W. De. Cytokine assays : An assessment of the preparation and treatment of blood and tissue samples. *Methods* **61**, 10–17 (2013).
263. Logozzi, M. *u.c.* High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One* **4**, 1–10 (2009).
264. Balaj, L. *u.c.* Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat. Commun.* **2**, 1–19 (2011).
265. Ko, J., Carpenter, E. & Issadore, D. Detection and isolation of circulating exosomes and microvesicles for cancer monitoring and diagnostics using micro-/nano-based devices. *Analyst* **141**, 450–460 (2016).
266. Malla, B., Aebersold, D. M. & Dal Pra, A. Protocol for serum exosomal miRNAs analysis in prostate cancer patients treated with radiotherapy. *J. Transl. Med.* **16**, 1–13 (2018).
267. Yu, Z. *u.c.* Pancreatic cancer-derived exosomes promote tumor metastasis and liver pre-metastatic niche formation. *Oncotarget* **8**, 63461–63483 (2017).
268. Pantel, K. & Alix-Panabières, C. Liquid biopsy : Potential and challenges. *Mol. Oncol.* **10**, 371–373 (2016).
269. Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J. & Gao, Z. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics* **7**, 789–804 (2017).
270. Yu, L.-L. *u.c.* A Comparison of Traditional and Novel Methods for the Separation of Exosomes from Human Samples. *Biomed Res. Int.* **2018**, 1–9 (2018).
271. Guo, S. C., Tao, S. C. & Dawn, H. Microfluidics-based on-a-chip systems for isolating and analysing extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* **7**, 1–15 (2018).
272. Xu, R., Greening, D. W., Zhu, H., Takahashi, N. & Simpson, R. J. Extracellular vesicle isolation and characterization : toward clinical application. *J. Clin. Invest.* **126**, 1152–1162 (2016).
273. Contreras-Naranjo, J. C., Wu, H. J. & Ugaz, V. M. Microfluidics for exosome isolation and analysis: Enabling liquid biopsy for personalized medicine. *Lab Chip* **17**, 3558–3577 (2017).
274. Wu, M. *u.c.* Isolation of exosomes from whole blood by integrating acoustics and microfluidics. *PNAS* **114**, 10584–10589 (2017).
275. Iliescu, F. S., Vrtačnik, D., Neuzil, P. & Iliescu, C. Microfluidic technology for clinical applications of exosomes. *Micromachines* **10**, 6–9 (2019).
276. Wan, S., Huang, J., Yan, H. & Liu, K. Size-controlled preparation of magnetite nanoparticles in the presence of graft copolymers. *J. Mater. Chem.* **16**, 298–303 (2006).
277. Ruíz-Baltazar, A., Esparza, R., Rosas, G. & Pérez, R. Effect of the Surfactant on the Growth and Oxidation of Iron Nanoparticles. *J. Nanomater.* **2015**, 240948 (2015).

278. Deobald, L. A., Crawford, Æ. R. L. & Paszczynski, A. J. Novel method for immobilization of enzymes to magnetic nanoparticles Novel method for immobilization of enzymes to magnetic nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* **10**, 1009–1025 (2008).
279. Xu, H. *u.c.* Antibody Conjugated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Cancer Cell Separation in Fresh Whole Blood. *Biomaterials* **32**, 9758–9765 (2011).
280. Efremova, M. V *u.c.* Magnetite-Gold nanohybrids as ideal all-in-one platforms for theranostics. *Sci. Rep.* **8**, 11295 (2018).
281. Seufferlein, T., Bachet, J. B., Van Cutsem, E. & Rougier, P. Pancreatic adenocarcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **23**, vii33–vii40 (2012).
282. Berger, H. J. *u.c.* Evaluation of a serologic marker, CA19-9, in the diagnosis of pancreatic cancer. *Ann. Intern. Med.* **110**, 704–709 (1989).
283. Kim, J. E. *u.c.* Clinical usefulness of carbohydrate antigen 19-9 as a screening test for pancreatic cancer in an asymptomatic population. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **19**, 182–186 (2004).
284. Uygur-Bayramiçli, O. Type 2 diabetes mellitus and CA 19-9 levels. *World J. Gastroenterol.* **13**, 5357–5359 (2014).
285. Luo, G. *u.c.* Patients with normal-range CA19-9 levels represent a distinct subgroup of pancreatic cancer patients. *Oncol. Lett.* **13**, 881–886 (2017).
286. Al-Shamsi, H. O., Alzahrani, M. & Wolff, R. A. The clinical utility of normal range carbohydrate antigen 19-9 level as a surrogate marker in evaluating response to treatment in pancreatic cancer-a report of two cases. *J. Gastrointest. Oncol.* **7**, E45–E51 (2016).
287. Kanwar, S. S., Dunlay, C. J., Simeone, D. M. & Negrath, S. Microfluidic device (ExoChip) for on-chip isolation, quantification and characterization of circulating exosomes. *Lab Chip* **14**, 1891–1900 (2014).
288. Ko, J. *u.c.* Combining Machine Learning and Nanofluidic Technology to Diagnose Pancreatic Cancer Using Exosomes. *ACS Nano* **11**, 11182–11193 (2017).
289. Taller, D. *u.c.* On-chip surface acoustic wave lysis and ion-exchange nanomembrane detection of exosomal RNA for pancreatic cancer study and diagnosis. *Lab Chip* **15**, 1656–1666 (2015).
290. Hui, C. *u.c.* Large-Scale Fe₃O₄ Nanoparticles Soluble in Water Synthesized by a Facile Method. *J. Phys. Chem. C* **112**, 11336–11339 (2008).
291. Layne, E. Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. *Methods Enzymol.* **3**, 447–455 (1957).
292. Stoscheck, C. M. Quantification of Protein. *1Methods Enzymol.* **182**, 50–69 (1990).
293. Ido, S. *u.c.* Immunoactive two-dimensional self-assembly of monoclonal antibodies in aqueous solution revealed by atomic force microscopy. *Nat. Mater.* **13**, 264–270 (2014).
294. Lim, J. M. *u.c.* Ultra-high throughput synthesis of nanoparticles with homogeneous size distribution using a coaxial turbulent jet mixer. *ACS Nano* **8**, 6056–6065 (2014).
295. Contreras-Naranjo, J. C., Wu, H. J. & Ugaz, V. M. Microfluidics for exosome isolation and analysis: Enabling liquid biopsy for personalized medicine. *Lab Chip* **17**, 3558–3577 (2017).
296. Turcheniuk, K., Tarasevych, A. V., Kukhar, V. P., Boukherroub, R. & Szunerits, S. Recent advances in surface chemistry strategies for the fabrication of functional iron oxide based magnetic nanoparticles. *Nanoscale* **5**, 10729–10752 (2013).
297. Hui, C. *u.c.* Large-Scale Fe₃O₄ Nanoparticles Soluble in Water Synthesized by a Facile Method. *J. Phys. Chem. C* **112**, 11336–11339 (2008).
298. Tomoiaga, A. M. *u.c.* Ultrasound-assisted rapid growth of water compatible magnetite Ultrasound-assisted rapid growth of water compatible magnetite nanoparticles. *J. Optoelectron. Adv. Mater.* **16**, 221–226 (2014).
299. Renuga Devi, T. S. & Gayathri, S. FTIR and FT-Raman spectral analysis of Paclitaxel drugs. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2**, 106–110 (2010).
300. Miyazawa, T., Shimanouchi, T. & Mizushima, S. I. Characteristic infrared bands of monosubstituted amides. *J. Chem. Phys.* **24**, 408–418 (1956).

301. Sharma, A. *u.c.* Physical characterization and in vivo organ distribution of coated iron oxide nanoparticles. *Sci. Rep.* **8**, 1–12 (2018).
302. Venkateswarlu, S. & Yoon, M. Core-Shell Ferromagnetic Nanorod Based on Amine Polymer Composite (Fe₃O₄@DAPF) for Fast Removal of Pb(II) from Aqueous Solutions. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 25362–25372 (2015).
303. Marzorati, S., Ragg, E. M., Longhi, M. & Formaro, L. Low-temperature intermediates to oxygen reduction reaction catalysts based on amine-modified metal-loaded carbons. An XPS and ss-NMR investigation. *Mater. Chem. Phys.* **162**, 234–243 (2015).
304. Saha, B., Evers, T. H. & Prins, M. W. J. How antibody surface coverage on nanoparticles determines the activity and kinetics of antigen capturing for biosensing. *Anal. Chem.* **86**, 8158–8166 (2014).
305. Deegan, R. D., Bakajin, O. & Dupont, T. F. Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature* **389**, 827–829 (1997).
306. Skotland, T., Sandvig, K. & Llorente, A. Lipids in exosomes : Current knowledge and the way forward. *Prog. Lipid Res.* **66**, 30–41 (2017).
307. Javeed, N. *u.c.* Pancreatic Cancer-Derived Exosomes Cause Paraneoplastic b-cell Dysfunction. *Clin. Cancer Res.* **21**, 1722–1733 (2014).
308. Arifin, D. R. *u.c.* Trimodal gadolinium-gold microcapsules containing pancreatic islet cells restore normoglycemia in diabetic mice and can be tracked by using US, CT, and positive-contrast MR imaging. *Radiology* **260**, 790–798 (2011).
309. Ni, J.-S., Li, Y., Yue, W., Liu, B. & Li, K. Nanoparticle-based Cell Trackers for Biomedical Applications. *Theranostics* **10**, 1923–1947 (2020).
310. Dykman, L. a & Khlebtsov, N. G. Gold nanoparticles in biology and medicine: recent advances and prospects. *Acta Naturae* **3**, 34–55 (2011).
311. Atanasijevic, T., Shusteff, M., Fam, P. & Jasanoff, A. Calcium-sensitive MRI contrast agents based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles and calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 14707 LP – 14712 (2006).
312. Knight, J. C., Edwards, G., Paisey, S. J. & Knight, J. C. RSC Advances Fluorinated contrast agents for magnetic resonance imaging ; a review of recent developments. *RSC Adv.* **1**, 1415–1425 (2011).
313. Wilhelm, S. *u.c.* Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat. Rev. Mater.* **1**, 1–12 (2016).
314. Obbs, S. U. K. H., Onsky, W. A. L. M., Uan, F. A. N. Y., Oberts, W. G. R. R. & Riffith, L. I. G. Regulation of transport pathways in tumor vessels : Role of tumor type and microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 4607–4612 (1998).
315. Sindhwani, S. *u.c.* The entry of nanoparticles into solid tumours. *Nat. Mater.* **19**, 566–575 (2020).
316. Jain, R. K. & Stylianopoulos, T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **7**, 653–664 (2010).
317. Wang, M. & Thanou, M. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacol. Res.* **62**, 90–99 (2010).
318. Wilhelm, S. *u.c.* Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat. Rev. Mater.* **1**, 1604 (2016).
319. Zhang, X. *u.c.* Trastuzumab-Coated Nanoparticles Loaded With Docetaxel for Breast Cancer Therapy. *Dose. Response.* **17**, 1559325819872583–1559325819872583 (2019).
320. Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y. & Hua, S. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Front. Pharmacol.* **6**, 1–13 (2015).
321. Edwards, K. A., Bolduc, O. R. & Baeumner, A. J. Miniaturized bioanalytical systems: enhanced performance through liposomes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **16**, 444–452 (2012).
322. Agrawal, U., Sharma, R., Gupta, M. & Vyas, S. P. Is nanotechnology a boon for oral drug delivery? *Drug Discov. Today* **19**, 1530–1546 (2014).
323. Lu, M. *u.c.* Exosome-based small RNA delivery: Progress and prospects. *Asian J. Pharm. Sci.* **13**, 1–11 (2018).
324. Han, C. *u.c.* Delivery of miR-675 by stem cell-derived exosomes encapsulated in silk

- fibroin hydrogel prevents aging-induced vascular dysfunction in mouse hindlimb. *Mater. Sci. Eng. C* **99**, 322–332 (2019).
325. Alhasan, A. H., Patel, P. C., Choi, C. H. J. & Mirkin, C. A. Exosome Encased Spherical Nucleic Acid Gold nanoparticle Conjugates As Potential MicroRNA Regulation Agents. *Small* **10**, 186–192 (2014).
 326. Kostova, I. Platinum Complexes as Anticancer Agents. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* **1**, 1–22 (2006).
 327. Stephens, I. E. L., Bondarenko, A. S., Grønbjerg, U., Rossmeisl, J. & Chorkendorff, I. Understanding the electrocatalysis of oxygen reduction on platinum and its alloys. *Energy Environ. Sci.* **5**, 6744–6762 (2012).
 328. Mironava, T., Simon, M., Rafailovich, M. H. & Rigas, B. Platinum folate nanoparticles toxicity: Cancer vs. normal cells. *Toxicol. Vitro* **27**, 882–889 (2013).
 329. ROSENBERG, B., VAN CAMP, L. & KRIGAS, T. Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* **205**, 698–699 (1965).
 330. Dasari, S. & Tchounwou, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* **740**, 364–378 (2014).
 331. Aldossary, S. A. Review on Pharmacology of Cisplatin : Clinical Use , Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin. *Biomed. Pharmacol. J.* **12**, 7–15 (2019).
 332. Makovec, T. Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiol. Oncol.* **53**, 148–158 (2019).
 333. Ghosh, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg. Chem.* **88**, 102925 (2019).
 334. Ali, I., Wani, W. A. & Haque, K. S. and A. Platinum Compounds: A Hope for Future Cancer Chemotherapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **13**, 296–306 (2013).
 335. Pekarik, V., Gumulec, J., Masarik, M. & Adam, R. K. and V. Prostate Cancer, miRNAs, Metallothioneins and Resistance to Cytostatic Drugs. *Current Medicinal Chemistry* **20**, 534–544 (2013).
 336. Hrabeta, J., Adam, V., Eckschlager, T., Frei, E. & Kizek, M. S. and R. Metal Containing Cytostatics and Their Interaction with Cellular Thiol Compounds Causing Chemoresistance. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **16**, 686–698 (2016).
 337. Boulikas, T. Low toxicity and anticancer activity of a novel liposomal cisplatin (Lipoplatin) in mouse xenografts. *Oncol. Rep.* **12**, 3–12 (2004).
 338. Stathopoulos, G. P., Boulikas, T., Kourvetaris, A. & Stathopoulos, J. Liposomal Oxaliplatin in the Treatment of Advanced Cancer : A Phase I Study. *Anticancer Res.* **1494**, 1489–1493 (2006).
 339. Jeyaraj, M., Gurunathan, S., Qasim, M., Kang, M. & Kim, J. A Comprehensive Review on the Synthesis , Characterization , and Biomedical Application of Platinum Nanoparticles. *Nanomaterials* **9**, 1719 (2019).
 340. Nejdli, L. *u.c.* Platinum nanoparticles induce damage to DNA and inhibit DNA replication. *PLoS One* **12**, e0180798 (2017).
 341. Cowley, B. A. & Woodward, B. A Healthy Future : Platinum in Medical Applications. *Platin. Met. Rev.* **55**, 98–107 (2011).
 342. Bendale, Y., Bendale, V., Natu, R. & Paul, S. Biosynthesized Platinum Nanoparticles Inhibit the Proliferation of Human Lung-Cancer Cells in vitro and Delay the Growth of a Human Lung-Tumor Xenograft in vivo. *J. Pharmacopuncture* **19**, 114–121 (2016).
 343. Porcel, E. *u.c.* Platinum nanoparticles: a promising material for future cancer therapy? *Nanotechnology* **21**, 85103 (2010).
 344. Alshatwi, A. A., Athinarayanan, J. & Vaiyapuri Subbarayan, P. Green synthesis of platinum nanoparticles that induce cell death and G2/M-phase cell cycle arrest in human cervical cancer cells. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **26**, 7 (2015).
 345. Pelka, J. *u.c.* Cellular Uptake of Platinum Nanoparticles in Human Colon Carcinoma Cells and Their Impact on Cellular Redox Systems and DNA Integrity. *Chem. Res. Toxicol.* **22**, 649–659 (2009).
 346. Murad, H., Hawat, M., Ekhtiar, A., Aljapawe, A. & Abbas, A. Induction of G1-phase cell cycle arrest and apoptosis pathway in MDA-MB-231 human breast cancer cells by

- sulfated polysaccharide extracted from *Laurencia papillosa*. *Cancer Cell Int.* 1–11 (2016). doi:10.1186/s12935-016-0315-4
347. Sletten, E. M. & Bertozzi, C. R. Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. *Angew. Chemie Int. Ed.* **48**, 6974–6998 (2009).
 348. Devaraj, N. K. The Future of Bioorthogonal Chemistry. *ACS Cent. Sci.* **4**, 952–959 (2018).
 349. Yusop, R. M., Unciti-Broceta, A., Johansson, E. M. V., Sánchez-Martín, R. M. & Bradley, M. Palladium-mediated intracellular chemistry. *Nat. Chem.* **3**, 239–243 (2011).
 350. Weiss, J. T. *u.c.* Extracellular palladium-catalysed dealkylation of 5-fluoro-1-propargyl-uracil as a bioorthogonally activated prodrug approach. *Nat. Commun.* **5**, 3277 (2014).
 351. Li, J. *u.c.* Palladium-triggered deprotection chemistry for protein activation in living cells. *Nat. Chem.* **6**, 352–361 (2014).
 352. Weiss, J. T. *u.c.* Development and Bioorthogonal Activation of Palladium-Labile Prodrugs of Gemcitabine. *J. Med. Chem.* **57**, 5395–5404 (2014).
 353. Rubio-Ruiz, B., Weiss, J. T. & Unciti-Broceta, A. Efficient Palladium-Triggered Release of Vorinostat from a Bioorthogonal Precursor. *J. Med. Chem.* **59**, 9974–9980 (2016).
 354. Bray, T. L. *u.c.* Bright insights into Palladium-triggered local chemotherapy. *Chem. Sci.* **9**, 7354–7360 (2018).
 355. Adam, C. *u.c.* Bioorthogonal Uncaging of the Active Metabolite of Irinotecan by Palladium-Functionalized Microdevices. *Chem. – A Eur. J.* **24**, 16783–16790 (2018).
 356. Stenton, B. J., Oliveira, B. L., Matos, M. J., Sinatra, L. & Bernardes, G. J. L. A thioether-directed palladium-cleavable linker for targeted bioorthogonal drug decaging. *Chem. Sci.* **9**, 4185–4189 (2018).
 357. Li, N., Lim, R. K. V., Edwardraja, S. & Lin, Q. Copper-Free Sonogashira Cross-Coupling for Functionalization of Alkyne-Encoded Proteins in Aqueous Medium and in Bacterial Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 15316–15319 (2011).
 358. Spicer, C. D., Triemer, T. & Davis, B. G. Palladium-Mediated Cell-Surface Labeling. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 800–803 (2012).
 359. Destito, P. *u.c.* Hollow nanoreactors for Pd-catalyzed Suzuki–Miyaura coupling and O-propargyl cleavage reactions in bio-relevant aqueous media. *Chem. Sci.* **10**, 2598–2603 (2019).
 360. Michel, B. W., Lippert, A. R. & Chang, C. J. A Reaction-Based Fluorescent Probe for Selective Imaging of Carbon Monoxide in Living Cells Using a Palladium-Mediated Carbonylation. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 15668–15671 (2012).
 361. Mann, G., Satish, G., Meledin, R., Vamiseti, G. B. & Brik, A. Palladium-Mediated Cleavage of Proteins with Thiazolidine-Modified Backbone in Live Cells. *Angew. Chemie Int. Ed.* **58**, 13540–13549 (2019).
 362. Giard, D. J. *u.c.* In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors2. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **51**, 1417–1423 (1973).
 363. Wang, F., Zhang, Y., Du, Z., Ren, J. & Qu, X. Designed heterogeneous palladium catalysts for reversible light-controlled bioorthogonal catalysis in living cells. *Nat. Commun.* **9**, 1209 (2018).
 364. Miller, M. *u.c.* Nano-palladium is a cellular catalyst for in vivo chemistry. *Nat. Commun.* **8**, 15906–15919 (2017).
 365. Hoop, M. *u.c.* Mobile Magnetic Nanocatalysts for Bioorthogonal Targeted Cancer Therapy. *Adv. Funct. Mater.* **28**, 1705920 (2018).
 366. Oxygen-independent, B., Weiss, J. T., Carragher, N. O. & Unciti-broceta, A. Palladium-Mediated Dealkylation of N-Propargyl-Floxuridine as a Bioorthogonal Oxygen-Independent Prodrug Strategy. *Scientif* **5**, 1–7 (2015).
 367. Clavadetscher, J. *u.c.* Copper Catalysis in Living Systems and In Situ Drug Synthesis. *Angew. Chemie Int. Ed.* **55**, 15662–15666 (2016).
 368. Pérez-López, A. M. *u.c.* Gold-Triggered Uncaging Chemistry in Living Systems. *Angew. Chemie Int. Ed.* **56**, 12548–12552 (2017).

369. Kennedy, L. C. *u.c.* A New Era for Cancer Treatment: Gold-Nanoparticle-Mediated Thermal Therapies. *Small* **7**, 169–183 (2011).
370. Huang, X. & El-sayed, M. A. Gold nanoparticles : Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *J. Adv. Res.* **1**, 13–28 (2006).
371. Huang, X., Jain, P. K. & El-sayed, I. H. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers Med Sci* **23**, 217–228 (2008).
372. Hu, M. *u.c.* Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* **35**, 1084–1094 (2006).
373. Li, J., Gupta, S. & Li, C. Research perspectives: gold nanoparticles in cancer theranostics. *Quant. Imaging Med. Surg.* **3**, 284–291 (2013).
374. O'Neal, D. P., Hirsch, L. R., Halas, N. J., Payne, J. D. & West, J. L. Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. *Cancer Lett.* **209**, 171–176 (2004).
375. Cheng, F.-Y., Chen, C.-T. & Yeh, C.-S. Comparative efficiencies of photothermal destruction of malignant cells using antibody-coated silica@Au nanoshells, hollow Au/Ag nanospheres and Au nanorods. *Nanotechnology* **20**, 425104 (2009).
376. Diagaradjane, P. *u.c.* Modulation of in vivo tumor radiation response via gold nanoshell-mediated vascular-focused hyperthermia: characterizing an integrated antihypoxic and localized vascular disrupting targeting strategy. *Nano Lett.* **8**, 1492–1500 (2008).
377. Stern, J. M. *u.c.* Initial Evaluation of the Safety of Nanoshell-Directed Photothermal Therapy in the Treatment of Prostate Disease. *Int. J. Toxicol.* **35**, 38–46 (2015).
378. von Maltzahn, G. *u.c.* Computationally Guided Photothermal Tumor Therapy Using Long-Circulating Gold Nanorod Antennas. *Cancer Res.* **69**, 3892 LP – 3900 (2009).
379. Cebrián, V. *u.c.* Enhancing of plasmonic photothermal therapy through heat-inducible transgene activity. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **9**, 646–656 (2013).
380. Gomez, L. *u.c.* Scaled-up production of plasmonic nanoparticles using microfluidics: from metal precursors to functionalized and sterilized nanoparticles. *Lab Chip* **14**, 325–332 (2014).
381. Kessentini, S. & Barchiesi, D. Quantitative comparison of optimized nanorods , nanoshells and hollow nanospheres for photothermal therapy. *Biomed. Opt. Express* **3**, 4431–4435 (2012).
382. Takagi, H., Azuma, K. & Tsuka, T. Antitumor effects of high - temperature hyperthermia on a glioma rat model. 1007–1010 (2014). doi:10.3892/ol.2014.1852
383. Zech, D., Rana, S., Büchler, M. W. & Zöller, M. Tumor-exosomes and leukocyte activation : an ambivalent crosstalk. 1–17 (2012).
384. Rana, S., Yue, S., Stadel, D. & Zöller, M. Toward tailored exosomes : The exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 1574–1584 (2012).
385. Toda, Y., Takata, K., Nakagawa, Y., Kawakami, H. & Fujioka, S. Effective internalization of U251-MG-secreted exosomes into cancer cells and characterization of their lipid components. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **456**, 768–773 (2015).
386. Aldewachi, H. *u.c.* Gold nanoparticle-based colorimetric biosensors. *Nanoscale* **10**, 18–33 (2018).
387. Farooq, M. U. *u.c.* Gold Nanoparticles-enabled Efficient Dual Delivery of Anticancer Therapeutics to HeLa Cells. *Sci. Rep.* **8**, 1–12 (2018).
388. Manohar, N., Reynoso, F. J., Diagaradjane, P. & Krishnan, S. Quantitative imaging of gold nanoparticle distribution in a tumor-bearing mouse using benchtop x-ray fluorescence computed tomography. *Nat. Publ. Gr.* **6**, 1–10 (2016).
389. Vidal, C., Destito, P., López, F. & Mascareñas, J. L. Concurrent and orthogonal gold(I) and ruthenium(II) catalysis inside living cells. *Nat. Commun.* **9**, 1–9 (2018).
390. Jain, P. K., Lee, K. S., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. A. Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine. *J. Phys. Chem. B* **110**, 7238–7248 (2006).
391. Barnes, W. L., Dereux, A. & Ebbesen, T. W. Surface plasmon subwavelength optics.

- Nature* **424**, 824–830 (2003).
392. He, H., Xie, C. & Ren, J. Nonbleaching Fluorescence of Gold Nanoparticles and Its Applications in Cancer Cell Imaging. *Anal. Chem.* **80**, 5951–5957 (2008).
 393. Debouttière, P.-J. *u.c.* Design of Gold Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging. *Adv. Funct. Mater.* **16**, 2330–2339 (2006).
 394. Popovtzer, R. *u.c.* Targeted Gold Nanoparticles enable Molecular CT Imaging of Cancer. *Nano Lett.* **8**, 4593–4596 (2009).
 395. Zhao, W., Brook, M. A. & Li, Y. Design of gold nanoparticle-based colorimetric biosensing assays. *Nat. Nanotechnol.* **9**, 2363–2371 (2008).
 396. Peng, G. *u.c.* Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **4**, 669–673 (2009).
 397. Neely, A. *u.c.* Ultrasensitive and highly selective detection of Alzheimer's disease biomarker using two-photon Rayleigh scattering properties of gold nanoparticle. *ACS Nano* **3**, 2834–2840 (2009).
 398. Tang, S. & Hewlett, I. Nanoparticle-Based Immunoassays for Sensitive and Early Detection of HIV-1 Capsid (p24) Antigen. *J. Infect. Dis.* **201**, S59–S64 (2010).
 399. Li, X. *u.c.* Functional gold nanoparticles as potent antimicrobial agents against multi-drug-resistant bacteria. *ACS Nano* **8**, 10682–10686 (2014).
 400. Agasti, S. S. *u.c.* Photoregulated Release of Caged Anticancer Drugs from Gold Nanoparticles to regulate drug release , minimizing side effects and improving. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 5728–5729 (2009).
 401. Weissleder, R. A clearer vision for in vivo imaging Progress. *Nat. Nanotechnol.* **19**, 316–317 (2001).
 402. Marcos-Campos, I. *u.c.* Cell death induced by the application of alternating magnetic fields to nanoparticle-loaded dendritic cells. *Nanotechnology* **22**, 205101 (2011).
 403. Baek, S.-K. *u.c.* Photothermal treatment of glioma; an in vitro study of macrophage-mediated delivery of gold nanoshells. *J. Neurooncol.* **104**, 439–448 (2011).
 404. Steinfeld, U., Pauli, C., Kaltz, N., Bergemann, C. & Lee, H.-H. T lymphocytes as potential therapeutic drug carrier for cancer treatment. *Int. J. Pharm.* **311**, 229–236 (2006).
 405. Belmar-Lopez, C. *u.c.* Tissue-derived mesenchymal stromal cells used as vehicles for anti-tumor therapy exert different in vivo effects on migration capacity and tumor growth. *BMC Med.* **11**, 139 (2013).
 406. Hagenhoff, A. *u.c.* Harnessing mesenchymal stem cell homing as an anticancer therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* **16**, 1079–1092 (2016).
 407. Wong, C. C.-L. *u.c.* Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 16369–16374 (2011).
 408. Wong, R. S. Y. Mesenchymal Stem Cells : Angels or Demons ? *J. Biomed. Biotechnol.* **459510**, 1–8 (2011).
 409. Sherman, L. S., Shaker, M., Mariotti, V. & Rameshwar, P. Mesenchymal stromal/stem cells in drug therapy: New perspective. *Cytotherapy* **19**, 19–27 (2017).
 410. Vakhshiteh, F., Atyabi, F. & Ostad, S. N. Mesenchymal stem cell exosomes: a two-edged sword in cancer therapy. *Int. J. Nanomedicine* **14**, 2847–2859 (2019).
 411. Maguire, G. Stem cell therapy without the cells. *Commun. Integr. Biol.* **6**, e26631 (2013).
 412. Yu, B., Zhang, X. & Li, X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 4142–4157 (2014).
 413. Shimaoka, M., Kawamoto, E., Gaowa, A., Okamoto, T. & Park, E. J. Connexins and Integrins in Exosomes. *Cancers (Basel)*. **11**, 106 (2019).
 414. Hoshino, A. *u.c.* Tumor exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **527**, 329–335 (2016).
 415. Pascucci, L. *u.c.* Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth : A new approach for drug delivery. *J. Control. Release* **192**, 262–270 (2014).
 416. Munoz, J. L. *u.c.* Delivery of Functional Anti-miR-9 by Mesenchymal Stem Cell-derived

- Exosomes to Glioblastoma Multiforme Cells Conferred Chemosensitivity. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2**, e126 (2013).
417. Gangadaran, P. *u.c.* In vivo Non-invasive Imaging of Derived From Red Blood Cells in Mice. *Front. P* **9**, 1–13 (2018).
 418. Grange, C. *u.c.* Biodistribution of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in a model of acute kidney injury monitored by optical imaging. *Int. J. Mol. Med.* 1055–1063 (2014). doi:10.3892/ijmm.2014.1663
 419. Kidd, S. *u.c.* Direct Evidence of Mesenchymal Stem Cell Tropism for Tumor and Wounding Microenvironments using In Vivo Bioluminescence Imaging. *Stem Cells* **27**, 2614–2623 (2009).
 420. Institutet, K., Nordin, J., Institutet, K. & Loughlin, A. O. Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. (2015). doi:10.3402/jev.v4.26316
 421. Wang, Y. & Grainger, D. W. Barriers to advancing nanotechnology to better improve and translate nanomedicines. *Front. Chem. Sci. Eng.* **8**, 265–275 (2014).
 422. Prabhakar, U. *u.c.* Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer research* **73**, 2412–2417 (2013).
 423. Binauld, S. *u.c.* Click chemistry step growth polymerization of novel α -azide- ω -alkyne monomers. *Chem. Commun.* 4138–4140 (2008). doi:10.1039/B805164J
 424. High, A., Prior, T., Bell, R. A. & Rangachari, P. K. Probing the "Active Site" of Diamine Oxidase: Structure-Activity Relations for Histamine Potentiation by O-Alkylhydroxylamines on Colonic Epithelium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **288**, 490–501 (1999).
 425. Wang, H. *u.c.* Discovery of (2E)-3-{2-Butyl-1-[2-(diethylamino)ethyl]-1H-benzimidazol-5-yl}-N-hydroxyacrylamide (SB939), an Orally Active Histone Deacetylase Inhibitor with a Superior Preclinical Profile. *J. Med. Chem.* **54**, 4694–4720 (2011).

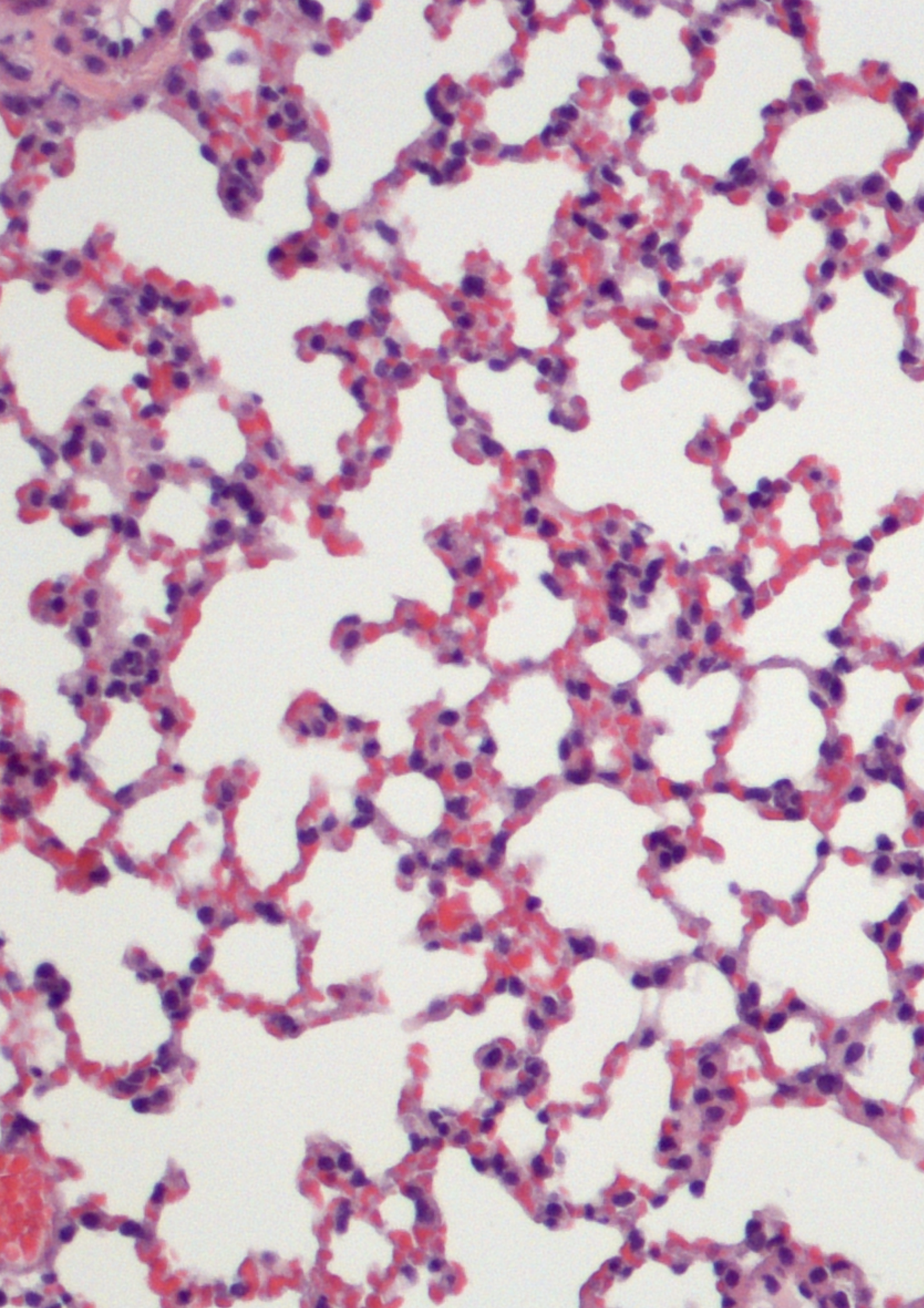


Imagen de microscopía convencional H&E tejido pulmonar

ANEXO 1: PUBLICACIONES

Durante el periodo de esta tesis doctoral, se han publicado los siguientes trabajos:

1. Encabo-Berzosa MM., Luján L., Sancho-Albero M., Gómez L., Sebastián V., Quintanilla M., Arruebo M., Santamaría J. and Martín-Duque P.; *RSC Advances*. **6** (63), 58723-58732. (2016).
2. Encabo-Berzosa MM., Sancho-Albero M., Crespo A., Andreu V., Sebastián V., Irusta S., Arruebo M., Martín-Duque P., and Santamaría J.; The effect of PEGylated Hollow Gold Nanoparticles on Stem Cell Migration. Potential Applications in Tissue Regeneration. *Nanoscale*. **9** (28), 9848-9858 (2017).
3. Encabo-Berzosa MM., Sancho-Albero M., Sebastián V., Irusta S., Arruebo M., Santamaría J. and Martín-Duque P.; Polymer functionalized gold nanoparticles as nonviral gene delivery reagents. *The Journal of Gene Medicine*, **19**, 1-12 (2017).
4. Sancho-Albero M., Navascués N., Mendoza G., Sebastián V., Arruebo M., Martín-Duque P. and Santamaría J.; Exosome origin determines cell targeting and the transfer of therapeutic nanoparticles towards target cells. *Journal of Nanobiotechnology*. **17** (1), 1-13 (2019).
5. Sancho-Albero M., Rubio-Ruiz B., Pérez-López A.M., Sebastián V., Martín-Duque P., Arruebo M., Santamaría J. and Unciti-Broceta A.; Cancer-derived exosomes loaded with ultrathin Palladium nanosheets for targeted bioorthogonal catalysis. *Nature Catalysis*. **2** (10), 864-872 (2019).
6. Sancho-Albero M., Encabo-Berzosa M.M, Beltrán-Visiedo M., Fernández-Messina L., Sebastián V., Sánchez-Madrid F., Arruebo M., Santamaría J. and Martín-Duque P.; Efficient encapsulation of large theragnostic nanoparticles in cell-derived exosomes: Leveraging the exosomal biogenesis pathway to obtain hollow gold nanoparticle-hybrids. *Nanoscale*. **11** (40), 18825-18836 (2019).

7. García-Salinas S., Gámez-Herrera E., Asín J., de Miguel R., Andreu V., Sancho-Albero M., Mendoza G., Irusta S. And Arruebo M.; Efficiency of antimicrobial eletrospun thymol-loaded polycaprolactone mats in vivo. *ACS Applied Bio Materials*, **3** (5), 3430-3439 (2020).

8. Gámez-Herrera E., García-Salinas S., Salido S., Sancho-Albero M., Andreu V., Pérez M., Luján L., Irusta S., Arruebo M. And Mendoza G.; Drug-Eluting would dressings having sustained release of antimicrobial compounds. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **152**, 327-339 (2020).

9. Sancho-Albero M., Mendel-Martinez A. And Martín-Duque P.; Use of exosomes as vectors to carry advanced therapies. *RSC Advances*. **10** (40), 23975-23987 (2020).

10. Sebastián V.*, Sancho-Albero M.*, Arruebo M*, Pérez-López A.M., Rubio-Ruiz B., Martín- Duque P., Unciti-Broceta A. and Santamaría J.; Non-destructive production of exosomes loaded with ultrathin Palladium nanosheets for targeted biorthogonal catalysis. *Nature Protocols*. (2020).

11. Sancho-Albero M., Sebastián V., Sesé J., Pazo-Cid R., Mendoza G., Arruebo M., Martín- Duque P and Santamaría J.; Isolation of exosomes from whole blood by a new microfluidic device. Proof of concept application in the diagnosis and monitoring of pancreatic cancer. Under review. *Journal of Nanobiotechnology* (2020).

ANEXO 2: CONTRUCCIONES A CONGRESOS

Durante el periodo de esta tesis doctoral, se han presentado las siguientes contribuciones a congresos:

1. Jesús Santamaría, M. Mar Encabo-Berzosa, María Sancho-Albero, Víctor Sebastián, Silvia Irusta, Manuel Arruebo and María Pilar Martín Duque (2017). Comparing transfection efficacy between lipoplexes and gold nanoparticles. EUROMAT, 17-22 septiembre. Abstract book F.2. Thessaloniki, Grecia.
2. María Sancho-Albero, M. Mar Encabo Berzosa, Víctor Sebastián, Silvia Irusta, Manuel Arruebo, Pilar Martín Duque, Jesús Santamaría, (2017). Polymer functionalized gold nanoparticles as non-viral gene delivery reagents. 25 th Anniversary Congress of the ESGCT, 17-20 octubre. Póster. Abstract book P384, Berlin, Alemania.
3. María Sancho-Albero, M. Mar Encabo Berzosa, Manuel Arruebo, Pilar Martín Duque, Jesús Santamaría, (2017). The effect of PEGylated Hollow Gold Nanoparticles on Stem Cell Migration. Potential Application in Tissue Regeneration. 25 th Anniversary Congress of the ESGCT, 17-20 octubre. Poster. Abstract book P279, Berlin, Alemania.
4. María Sancho-Albero, Manuel Beltrán Visiedo, M. Mar Encabo-Berzosa, Victor Sebastian, Manuel Arruebo, Jesus Santamaria and Pilar Martín Duque (2018). A comparative study of methodologies to encapsulate gold nanoparticles into exosomes for theragnsosis. Annual meeting International Society for Extracellular Vesicles (ISEV2018), 2-6 mayo. Póster. Abstract book PS02.06, Barcelona, España.
5. María Sancho-Albero, Manuel Beltrán-Visiedo, M.Mar Encabo-Berzosa, Víctor Sebastian, Manuel Arruebo, Jesús Santamaría and Pilar Martín Duque (2018). Encapsulation of gold nanoparticles within cell membrane-derived vesicles (exosomes) for theragnostics. XXXV Jornadas Nacionales de Ingeniería Química, 4-6 julio, Presentación Flask, Salamanca, España.
6. María Sancho-Albero, Nuria Navascués, Gracia Mendoza, Víctor Sebastián, Manuel Arruebo, Pilar Martín-Duque and Jesús Santamaría (2019). Specific transfer of hollow gold nanoparticles within exosomes is determined by the exosome origin. Annual meeting International Society for Extracellular Vesicles

(ISEV2019), 24-28 abril. Presentación oral. Abstract book OS24.04. Kyoto, Japón.

7. María Sancho-Albero, Belén Rubio-Ruiz, Ana M. Pérez-López, Víctor Sebastián, Pilar Martín-Duque, Manuel Arruebo, Asier Unciti-Broceta and Jesús Santamaría (2019). Exosomas tumorales cargados con nanoláminas de paladio para catálisis bioortogonal dirigida. XXXVI Jornadas Nacionales de Ingeniería Química, 4-6 septiembre. Presentación oral. Zaragoza, España.
8. María Sancho-Albero, B. Rubio-Ruiz, A.M. Pérez-López, V. Sebastián, P. Martín Duque, M. Arruebo, A. Unciti-Broceta and J. Santamaría (2019). Cancer-derived exosomes loaded with ultrathin palladium nanosheets for targeted bioorthogonal catalysis. 27 th Anniversary Congress of the ESGCT, 12-25 octubre. Póster Barcelona, España.
9. María Sancho-Albero, N. Navascués, G. Mendoza, V. Sebastián, M. Arruebo, P. Martín-Duque and J. Santamaría (2019). Combination of exosomes and near-infrared responsive gold nanoparticles: new selective and specific therapeutic vehicle. 27 th Anniversary Congress of the ESGCT, 12-25 octubre. Póster. Barcelona, España.

ANEXO 3: INFORME DICTAMEN CEICA



Informe Dictamen Favorable
Proyecto Investigación Biomédica

C.P. - C.I. PI18/198

04 de julio de 2018

Dña. María González Hínjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

CERTIFICA

1º. Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 04/07/2018, Acta Nº 13/2018 ha evaluado la propuesta del investigador referida al estudio:

Título: EXTRACCIÓN DE EXOSOMAS DE TUMORES Y PLASMA DE PACIENTES CON DIVERSOS GRADOS DE MALIGNIDAD, PARA EL ESTUDIO DE SU COMPOSICIÓN Y CORRELACIÓN CLÍNICA

Investigadora Principal: María del Pilar Martín Duque, IACS

Versión protocolo: v2, 28/06/2018

Documento de información y consentimiento: v2, 28/06/2018

2º. Considera que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuado el tratamiento de los datos y los documentos dirigidos a obtener el consentimiento de los participantes.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

3º. Por lo que este CEIC emite **DICTAMEN FAVORABLE** a la realización del proyecto.

Lo que firmo en Zaragoza

GONZALEZ
HINJOS MARIA
DNI 03857456B

Firmado digitalmente
por GONZALEZ HINJOS
MARIA - DNI 03857456B
Fecha: 2018.07.05
15:26:21 +02'00'

María González Hínjos
Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

ANEXO 4: METODOLOGÍA ADICIONAL. Pd-Exos^{A549} **COMO AGENTES CATALÍTICOS BIOORTOGONALES**

Síntesis del sensor 1 susceptible de ser modificado por Pd

La síntesis del sensor 1 se llevó a cabo por la Dra. Belén Rubio y la Dra. Ana Pérez del grupo de investigación del Prof. Asier Unciti de la Universidad de Edimburgo. Resumidamente, para generar el compuesto 1 o proresofurina, en primer lugar 300 mg (1,4 mmol) el compuesto 2 (resofurina) y 390 μ L (2,8 mmol) de 1,8-diazbicyclo [5.4.0]undec-7-eno (DBU) se disolvieron en dimetilformamida (DMF) seca (5 mL) en una atmósfera de N₂. Posteriormente, 240 μ L (2,8 mmol) de bromuro de propargilo de disolvieron en 0,5 mL de DMF seca y se añadieron gota a gota a la disolución anterior. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas, se eliminó el disolvente y finalmente se añadió diclorometano (DCM) para obtener un sólido precipitado. La mezcla se filtró y el compuesto resultante se lavó dos veces con 10 mL de H₂O en un embudo de separación.

Por último, se secó la fase orgánica utilizando MgSO₄ anhidro y el crudo se purificó mediante cromatografía TLC (2,5 % de MeOH en CH₂Cl₂), hasta obtener el compuesto 1 como un sólido naranja. La **figura A.1** ilustra la reacción química llevada a cabo para sintetizar el compuesto 1.

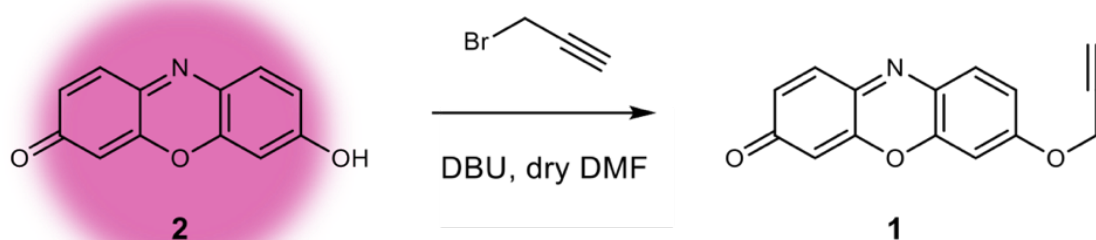


Figura A.1. Reacción química llevada a cabo para sintetizar la proresofurina (compuesto 1) a partir del fármaco resofurina (compuesto 2).

Síntesis de la prodroga 4

La prodroga 4 fue también sintetizada en la Universidad de Edimburgo. Para ello, se siguió la reacción mostrada en la **figura A.2**. En primer lugar se sintetizó el compuesto 5 (*bromuro de p-(propargiloxi)bencilo*). Para ello, el alcohol 4-*Hidroxibenzil* se trató con bromuro de propargilo y K₂CO₃ para dar lugar al alcohol *p*-

(*propargiloxi*)*bencilo*, el cual se convirtió finalmente en su correspondiente intermedio halogenado utilizando CBr₄/PPh₃.⁴²³

En la siguiente etapa, se sintetizó el compuesto 6 (*N*-[4-(*propargiloxi*)*benziloxi*]ftalamida) siguiendo un procedimiento previamente descrito para la síntesis de otras *N*-(alquil)ftalamidas.⁴²⁴ Resumidamente, 360 mg (2,2 mmol) de *N*-hidroxi*ftalamida* se disolvieron en DMF seca bajo una atmósfera de nitrógeno. Esta solución se añadió a una suspensión que contenía 2,6 mmol de NaH en DMF, dando lugar a una solución roja opaca. Posteriormente, el compuesto 5 (4,4 mmol) disuelto en DMF se añadió gota a gota a la mezcla anterior, y la reacción se calentó hasta 70 °C durante 24 horas bajo agitación magnética. El disolvente DMF se eliminó y el residuo se suspendió en CHCl₃ y se lavó con H₂O, NHSO₃/Na₂CO₃ (aq). El CHCl₃ se secó con Na₂SO₄ anhidro hasta evaporarlo completamente. El sólido resultante se recrystalizó obteniéndose un sólido de color amarillo pálido.

A continuación se generó el compuesto 7. Para ello, 350 mg del compuesto 6 (1,1 mmol) se disolvieron en 6 mL de dietil éter conteniendo hidracina monohidrato (2,2 mmol). La mezcla se llevó a agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, el residuo sólido se obtuvo por filtración y se añadió HCl en éter (2M, 4 mL) bajo agitación continua. La reacción se agitó de nuevo durante 2 horas más y el compuesto resultante se filtró y secó, dando lugar al compuesto 7 en forma de un sólido blanco.

El compuesto 8 ((*E*)-*metil* 3-(4-{[2-(2-*metil*-1*H*-indol-3-il)etilamino]*metil*}fenil)acrilato) se sintetizó según lo indicado en literatura.⁴²⁵ Posteriormente, una disolución acuosa de NaOH 1N (0,5 mL) se añadió gota a gota sobre 140 mg (0,4 mmol) de este compuesto 8 contenidos en THF/H₂O (1:5; 2,5 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche y se acidificó utilizando una disolución acuosa de HCl 3N. El precipitado resultante se filtró y lavó minuciosamente con CH₃CN y se secó a vacío para dar lugar al compuesto 9.

En la última etapa del proceso de síntesis de este profármaco, 25 mg del compuesto 9 (0,075 mmol) y 24 mg del compuesto 7 (0,112 mmol) se añadieron a 1 mL de H₂O. Posteriormente, 43 mg de *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida clorohidrato (0,225 mmol) se añadieron a la muestra. La reacción se mantuvo en agitación durante 6 horas a temperatura ambiente y a pH constante 4,5. Finalmente, se eliminó el agua y el producto obtenido se suspendió en acetonitrilo y filtrado a vacío. Por último, la solución final se purificó mediante cromatografía TLC con DCM:MeOH 7:3

dando lugar al compuesto 4 en forma de un sólido amarillo. La **figura VII.10** ilustra paso a paso la síntesis de la profármaco (compuesto 4).

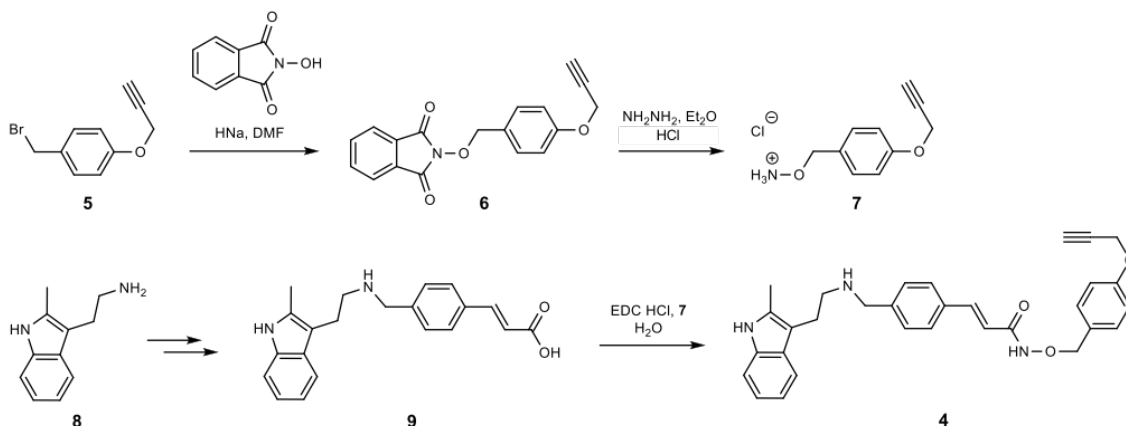


Figura A.2. Descripción de las etapas realizadas para sintetizar el compuesto 4 (profármaco).

Determinación de la fluorescencia de los compuestos 1 y 2

A continuación se describe la metodología empleada para medir la fluorescencia de los compuestos 1 y 2 (de la proresofurina y de la resofurina, respectivamente). En primer lugar se prepararon disoluciones de ambos compuestos en PBS a una concentración de 25 μM y pH 7,4. Para su completa y correcta homogeneización, las mezclas se agitaron a 1200 rpm durante 10 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$. La fluorescencia de ambos compuestos se cuantificó en el fluoroespectrómetro NanoDrop 330 (excitación 460-650 nm). Una disolución de PBS se utilizó como blanco.

En otro experimento, 0,6; 0,8; 1 y 2 μg de Pd-Exos^{A549} se añadieron a una solución de 500 μL del compuesto 1 en PBS (100 μM) para obtener concentraciones finales de 0,12; 0,16; 0,20 y 0,40 μg de Pd-Exos^{A549} en 100 μL , respectivamente. Las mezclas se agitaron a 700 rpm a 37 $^{\circ}\text{C}$ y la fluorescencia de la reacción se monitorizó durante 16 horas utilizando un lector PerkinElmer En Vision 2120 (ex/em 540/590 nm). El compuesto 1 sólo (100 μM) o en presencia de exosomas sin PdNSs en su interior (Exos^{A549}), se utilizó como control negativo. Por lo contrario, el compuesto fluorescente 2 o resofurina (100 μM) se empleó como referencia (control positivo). El porcentaje de conversión del compuesto 1 al compuesto 2, es decir, de la proresofurina a la resofurina mediado por los Pd-Exos^{A549}, se estimó a partir del control positivo.

Un experimento de microscopía time-lapse se realizó para visualizar a tiempo real la activación del compuesto 1 y su transformación al compuesto 2 (fluorescente) mediada por los Pd-Exos^{A549}. Se empleó un microscopio Time-Lapse (Leica AF6000 LX) con un objetivo 20x (Ex/em 560/630 nm) para visualizar: 1) 0,5 mL del compuesto 1 (20

μM) como control negativo (no fluorescente); 2) 0,5 mL del compuesto 2 (20 μM) como control positivo (fluorescente); y 3) el compuesto 1 (0,5 mL, 20 μM) en presencia de los Pd-Exos^{A549}. Las muestras se depositaron en una placa μ -Slice (Ibidi) de 8 pocillos y se observaron durante 24 horas. Las imágenes se tomaron cada 15 minutos y los videos conteniendo la secuencia completa se realizaron con el software Image J (v.1.49).

Reciclaje de los Pd-Exos

Tras corroborar que los Pd-Exos^{A549} eran catalíticamente activos y que eran capaces de mediar la conversión del compuesto 1 al compuesto 2, se evaluó su posible recuperación y reutilización sucesivas veces. Para ello, una vez que los Pd-Exos^{A549} llevaron acabo una primera reacción del compuesto 1 al 2 en las condiciones experimentales descritas en la sección anterior, estos se recuperaron a través de centrifugación (13000 rpm durante 30 minutos) y una disolución fresca del compuesto 1 en PBS (100 μM) se añadió sobre estos Pd-Exos^{A549} recuperados. Las mezclas se agitaron de nuevo a 700 rpm a 37 °C y se siguió la fluorescencia de la reacción (es decir, la aparición del compuesto 2) durante 16 horas con un lector PerkinElmer En Vision 2120 (ex/em 540/590 nm). Este ciclo se repitió tres veces.

Determinación de la constante de reacción (K)

Para determinar la constante de reacción, 1 μg de Pd-Exos^{A549} se añadió a 500 μL de una disolución del compuesto 1 a diferentes concentraciones (25, 50 y 100 μM) en PBS. Las mezclas se agitaron a 700 rpm a 37 °C y la reacción se monitorizó durante 24 horas midiendo la fluorescencia generada en un lector PerkinElmer En Vision 2120 (ex/em 540/590). La concentración del compuesto 2 generado se calculó en base a la intensidad de fluorescencia del compuesto 2 (resofurina) como control positivo (también con concentraciones de 25, 50 y 100 μM). La constante de reacción (K) se estimó a partir una regresión lineal de los datos experimentales representando el Ln de la concentración del compuesto 1 frente al tiempo, obteniendo el valor de K como la pendiente de dichas curvas experimentales.

Para sintetizar este fármaco, en primer lugar se intentó una estrategia sin éxito (debido a la presencia de varios grupos nucleofílicos en la molécula) de alquilación de los grupos OH del Panobinostat® (3) con *p*-(propargiloxi)benzil bromuro.³⁵³ Consecuentemente se exploró una estrategia alternativa en la cual el compuesto 4 (profármaco) se sintetizó totalmente desde cero, siguiendo el protocolo esquematizado en la **figura A.2**.

ANEXO 5: MONTAJE EXPERIMENTAL: IRRADIACION DE ANIMALES CON LÁSER NIR

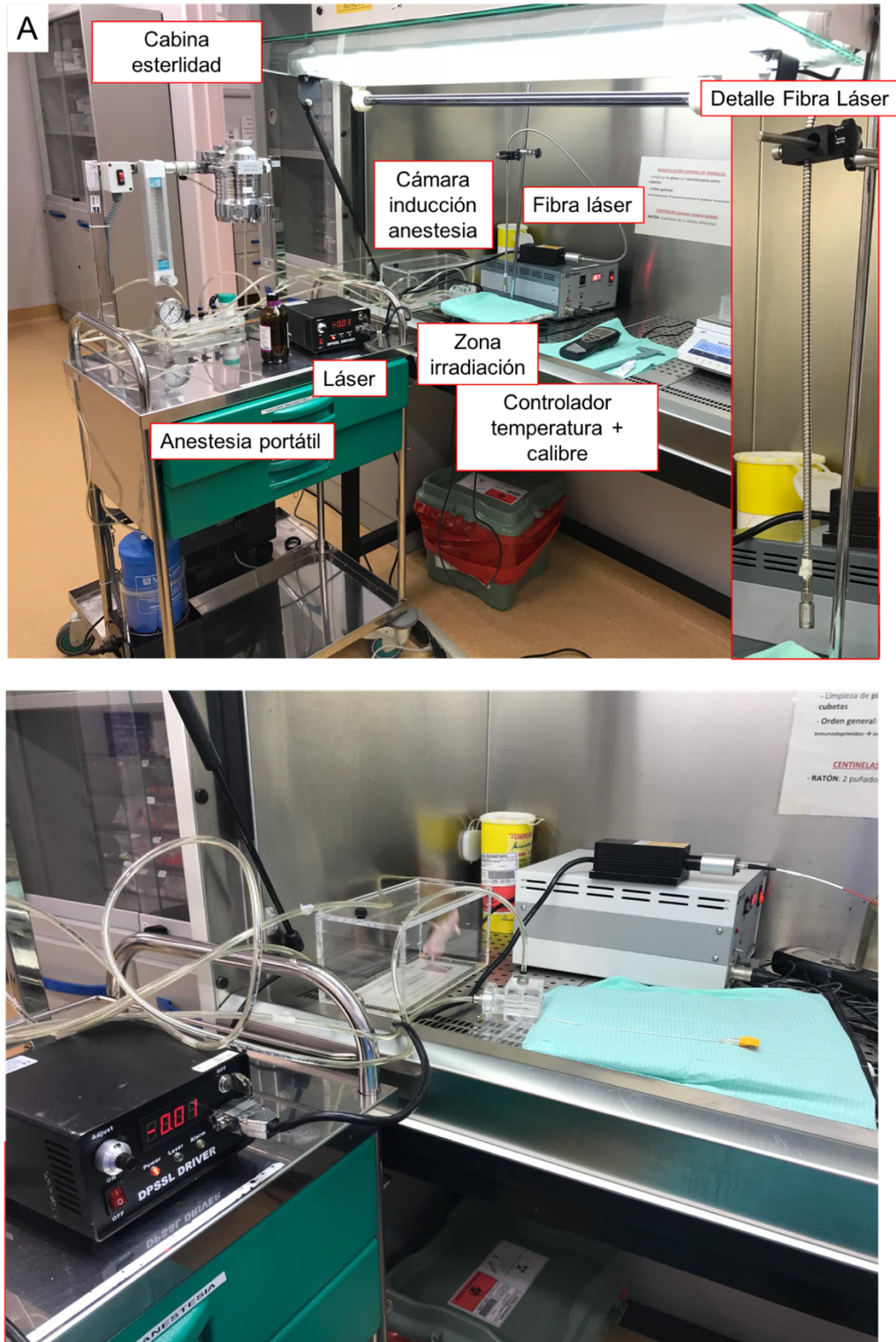


Figura A.3. Montaje experimental del área de trabajo para realizar la irradiación de los tumores en el modelo animal conteniendo A) el tumor xenograft y B) las regiones multinodulares en el páncreas.

