

Trabajo Fin de Máster

Estudio de vesículas extracelulares como vehículo de entrega de
nanopartículas contra el cáncer.

Study of extracellular vesicles as delivery carriers of nanoparticles
against cancer.

Autor/es

Alba González Martínez

Director/es

María Sancho Albero

Víctor Sebastián Cabeza

Ponente/es

Jesús Santamaría Ramiro

Facultad de Ciencias

Máster en Biología Molecular y Celular

Curso 2023/2024

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores de TFM, María Sancho y Víctor Sebastián, sin cuya guía y apoyo constante este trabajo no habría sido posible. Agradezco profundamente la paciencia, el conocimiento compartido y las valiosas enseñanzas que me han brindado a lo largo de este proceso.

Al grupo NFP, gracias por acogerme y facilitar mi inclusión en esta investigación, brindándome la oportunidad de crecer como profesional. Un agradecimiento especial a Irene Orera del SCT Proteómica del IACS por su ayuda con el análisis proteómico, así como a Javier Godino y Beatriz Jimeno del SCT Separación Celular y Citometría del IACS. También, gracias a César Vallejo y María Royo del SCT Microscopía e Imagen del IACS por su colaboración en la microscopía y a Joaquín Sanz del BIFI por el análisis bioinformático.

Finalmente, a mis amigas, amigos, familia y a todas las personas que de alguna manera han sido parte de este proceso, gracias por el apoyo, la compañía y la inspiración que me han ayudado a llegar hasta aquí.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN.....	8
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Contextualización del cáncer:.....	9
1.2. Nanopartículas como terapia contra el cáncer	9
1.3. Métodos de entrega convencionales, efecto EPR y direccionamiento activo y caballos de troya	10
1.4. Vesículas extracelulares y exosomas como vehículos de entrega:	11
1.5. Papel fundamental e implicación de la corona de proteínas.....	13
2. OBJETIVO.....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Síntesis de nanopartículas mediante reducción en atmósfera de monóxido de carbono	15
3.2. Caracterización fisicoquímica de las diferentes nanopartículas.	16
3.3. Líneas celulares	17
3.3.1. Mantenimiento.....	17
3.3.2. Congelación y descongelación.....	17
3.4. Aislamiento de exosomas por ultracentrifugación	18
3.4.1. Obtención del medio Ultracen	18
3.4.2. Aislamiento de exosomas	18
3.5. Caracterización de los exosomas.....	19
3.6. Generación in-situ de nanopartículas en el interior de los exosomas.	19
3.6.1. Incubación de los exosomas con precursores metálicos	19
3.6.2. Generación de nanopartículas por reducción con monóxido de carbono.....	20
3.7. Caracterización biológica de los exosomas con las nanopartículas en su interior.	21
3.8. Estudios de corona de proteínas, estudios de agregación y estabilidad en fluidos biológicos.	21
3.8.1. Proceso de generación de la corona de proteínas en las nanopartículas en contacto con DMEM	21
3.8.2. Proceso de generación de la corona de proteínas en los exosomas en contacto con DMEM.....	22
3.8.3. Caracterización de la corona de proteínas	22

3.9.	<i>Estudio de internalización y captura selectiva.....</i>	23
3.9.1.	Experimentos de microscopia confocal	23
3.9.2.	Espectroscopía de emisión atómica con plasma de microondas	24
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1.	<i>Síntesis y caracterización de nanopartículas.....</i>	24
4.1.1.	Nanoláminas de Pd.....	24
4.1.2.	Nanopartículas de Pt	26
4.1.3.	Nanopartículas de Au	27
4.2.	<i>Aislamiento y caracterización de exosomas de células de glioblastoma humano.....</i>	30
4.3.	<i>Generación in situ de nanopartículas en el interior de exosomas mediante reducción en atmósfera de monóxido de carbono.....</i>	32
4.3.1.	Exosomas derivados de células U251-MG cargados con nanoláminas de Pd	32
4.3.2.	Exosomas derivados de células U251-MG cargados con nanopartículas de Pt....	34
4.3.3.	Exosomas derivados de células U251-MG cargados con nanopartículas de Au ...	35
4.4.	<i>Estudio de la corona de proteínas</i>	38
4.4.1.	Estudio de la corona de proteínas de las nanopartículas	39
4.4.2.	Estudio de la corona de proteínas de los exosomas.....	44
4.4.3.	Estudio proteómico	49
4.5.	<i>Evaluación de la internalización de nanopartículas y exosomas en distintas líneas celulares</i>	56
5.	CONCLUSIONES.....	62
6.	BIBLIOGRAFÍA	64
ANEXOS.....		70
	<i>ANEXO 1. TÉCNICAS EMPLEADAS: FUNDAMENTO, EQUIPO Y USO</i>	70
	<i>ANEXO 2. GRÁFICAS DE LOS ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES.....</i>	80
	<i>ANEXO 3. DIAGRAMAS DE VENN.....</i>	82

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
Au-Exos^{U251-MG}	Exosomas derivados de células U251-MG cargados con AuNPs
AuCit NPs	Nanopartículas de Au estabilizadas con citrato
AuLys NPs	Nanopartículas de Au estabilizadas con lisina
AuNPs	Nanopartículas de Au
BCA	Ácido bicinconínico
BIFI	Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos
BSA	Albúmina sérica
CCD	Detector de carga acoplada
CIBA	Centro de Investigación Biomédica de Aragón
CP	Corona de proteínas
DE	Análisis de expresión diferencial
dH₂O	Agua destilada
DLS	Dispersión dinámica de la luz
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTGS	Detector de sulfato de triglicina deuterado
EPR	Efecto de permeabilidad y retención aumentada
Exos^{U251-MG}	Exosomas derivados de células U251-MG
FBS	Suero fetal bovino
FTIR	Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier
IACS	Servicio Científico Técnico del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud
INMA	Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón
INSST	Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo
LMA	Laboratorio de Microscopías Avanzadas
mARN	ARN mensajero
miARN	microARN
MP-AES	Espectroscopía de emisión atómica con plasma de microondas

MVBs	Cuerpos multivesiculares
NFP	Partículas y Películas Nanoestructuradas
NIR	Espectro de infrarrojo cercano
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología
NPs	Nanopartículas
NPs-Exos^{U251-MG}	Exosomas derivados de células U251-MG cargados con NPs
NSs	Nanoláminas
NTA	Análisis de rastreo de nanopartículas
PBS	Disolución salina tamponada con fosfato
PBS-BSA	Tampón fosfato salino con albúmina sérica
PBS-BSA-saponina	Tampón fosfato salino con albúmina sérica con saponina
PCAs	Análisis de componentes principales
Pd-Exos^{U251-MG}	Exosomas derivados de células U251-MG cargados con PdNSs
PdNSs	Nanoláminas de Pd
PEG	Polietilenglicol
PFA	Paraformaldehído
Pt-Exos^{U251-MG}	Exosomas derivados de células U251-MG cargados con PtNPs
PTA	Ácido fosfotúngstico
PtNPs	Nanopartículas de Pt
PVP	Polivinilpirrolidona
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
siARN	ARN de silenciamiento
SPR	Resonancia de Plasmón Superficial
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
UV-Vis	Ultravioleta visible
VEs	Vesículas extracelulares
VLA-EC	Valor limite ambiental de corta duración

RESUMEN

El trabajo presentado en esta memoria, titulado “Estudio de vesículas extracelulares como vehículo de entrega de nanopartículas contra el 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.

Los exosomas son vesículas extracelulares (VEs) de pequeño tamaño, aproximadamente 100 nm de diámetro, rodeadas por una bicapa lipídica. Estas vesículas tienen la capacidad de transferir material e información de manera selectiva entre células, desempeñando un papel crucial en la comunicación intercelular, lo que los convierte en una opción innovadora para el transporte de fármacos, moléculas y nanopartículas (NPs) hacia tejidos y células diana, con aplicaciones prometedoras.

El uso de VEs como vehículos de transporte de productos derivados de la nanotecnología se postula como una estrategia alternativa y prometedora para desarrollar tratamientos selectivos contra el cáncer. Este trabajo presenta un estudio de los factores clave que influyen en el destino de los exosomas cargados con productos terapéuticos derivados de la nanotecnología, con el objetivo de minimizar su reconocimiento y eliminación por el sistema inmunitario, optimizar su entrega al tumor y mejorar su eficacia terapéutica. Además, se describen los resultados de la caracterización de estos exosomas combinados con nanopartículas.

ABSTRACT

The work herein presented, titled “Study of extracellular vesicles as delivery vehicles for nanoparticles against cancer,” 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.

Exosomes are small extracellular vesicles, approximately 100 nm in diameter, surrounded by a lipid bilayer. These vesicles have the ability to selectively transfer material and information between cells, playing a crucial role in intercellular communication processes. This makes them an innovative option for the transport of drugs, molecules, and nanoparticles to target tissues and cells, with promising applications.

The use of these vesicles as vehicles for the transport of nanotechnological products has been exploited in the last years for the developments of selective therapeutic strategies against cancer. This work presents a study of key factors that influence the fate of exosomes loaded with nanotechnology-derived therapeutic products, aiming to minimize their recognition and elimination by the immune system, optimize their delivery to tumors, and enhance their therapeutic efficacy. Additionally, the results of the characterization of these exosomes combined with nanoparticles are described.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Contextualización del cáncer:

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado y la división anormal de células dando lugar a la formación de agregados celulares conocidos como tumor que pueden invadir y destruir tejido corporal sano, dañando tejidos vecinos, alterando su homeostasis y fisiología. Esta proliferación celular anormal se debe a mutaciones en los genes que regulan el ciclo celular, permitiendo a las células cancerosas evadir los mecanismos de control normales del organismo. El cáncer puede originarse en casi cualquier tejido del cuerpo y a menudo se clasifica según el órgano o el tipo de célula donde se inicia [1].

A nivel mundial, el cáncer constituye uno de los problemas de salud más significativos y es la segunda causa principal de muerte. En 2022 se estimaron 20 millones de nuevos casos de cáncer a nivel mundial y 9,7 millones de muertes, con 53,5 millones de supervivientes a cinco años del diagnóstico [2]. Aproximadamente 1 de cada 5 personas desarrollará cáncer en su vida, y 1 de cada 9 hombres y 1 de cada 12 mujeres morirán por esta causa. Se prevé que para 2050 los nuevos casos superen los 35 millones, un aumento del 77% respecto a 2022, impulsado por el envejecimiento poblacional y factores de riesgo como el tabaco, alcohol, obesidad y contaminación del aire [2]. En España, se espera que en 2024 se diagnostiquen 286.664 nuevos casos de cáncer, un leve incremento respecto a 2023. Aunque el aumento de diagnósticos es inevitable, la detección precoz y los cambios demográficos podrían reducir la mortalidad a largo plazo [3].

Los enfoques terapéuticos convencionales y emergentes utilizados en el tratamiento del cáncer incluyen cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia dirigida, inmunoterapia y terapia hormonal. La quimioterapia como la radioterapia utilizan moléculas citotóxicas o radiación de alta energía, respectivamente, para detener la proliferación celular y destruir las células cancerosas [4]. Sin embargo, también afectan a tejidos sanos y, frecuentemente, su eficacia contra el tumor es muy reducida por lo que han de ser combinadas con cirugía. Además, aunque estos fármacos se administran en dosis bajas, la escasa especificidad del tratamiento proporciona la aparición de efectos sistémicos no deseados (a nivel digestivo, nervioso o muscular, entre otros), lo que repercute negativamente en la calidad de vida del paciente y con frecuencia obliga a disminuir la cantidad de fármacos administrados, lo que, a su vez reduce la efectividad del tratamiento y la aparición de resistencias y/o recidivas.

Es por ello por lo que muchas formas de cáncer siguen siendo difíciles de tratar, lo que hace crucial la investigación para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas emergentes. Entre estos abordajes novedosos, destacan las terapias avanzadas como la terapia celular, la terapia génica y la nanotecnología.

1.2. Nanopartículas como terapia contra el cáncer

La nanotecnología es una disciplina emergente que comenzó a desarrollarse a finales del siglo XX. Esta se centra en la manipulación y el uso de materiales a escala nanométrica, es decir, a una escala de 10^{-9} metros [5][6]. En los últimos años, ha despertado un gran interés debido a su aplicación en diversos campos como la biología, la energía, el medioambiente, la medicina, la electrónica, la alimentación y la construcción, entre otros [5][6][7]. La nanotecnología permite la creación y utilización de nuevos materiales avanzados con dimensiones en escala

nanométrica, los cuales presentan propiedades únicas, diferentes a las de sus contrapartes macroscópicas [8]. Dentro de los productos nanotecnológicos, las nanopartículas (NPs) son partículas que, por definición, tienen un tamaño en el rango de 1 a 500 nm [9], lo que les confiere propiedades únicas y las hace especialmente adecuadas para aplicaciones biomédicas, incluido el tratamiento del cáncer [10]. El tamaño nanométrico de las NPs, junto con otras propiedades exclusivas del cambio de escala, proporciona una superficie relativamente grande para la conjugación o la encapsulación de diversos ligandos, como ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), péptidos, aptámeros, anticuerpos, fármacos, etc [11].

La modificación de la superficie de estas NPs con moléculas específicas (como por ejemplo anticuerpos, azúcares o aptámeros), permiten la entrega y el direccionamiento específicos y selectivos de las NPs funcionalizadas al sitio tumoral, mejorando la farmacocinética y aumentando la eficacia terapéutica en el tratamiento del cáncer en la diana. Las NPs también están siendo investigadas como vehículos inmunogénicos en radioterapia, quimioterapia y terapias adyuvantes avanzadas, ampliando su potencial en la oncología moderna [12]. Algunos ejemplos objeto de interés en los últimos años son el uso de NPs magnéticas para erradicar tumores por hipertermia magnética tras la irradiación de dichas NPs con un campo magnético, o el uso de NPs de Au (AuNPs) como agentes de hipertermia óptica.

Dado su pequeño tamaño, las NPs también tienen la capacidad de penetrar profundamente en el tejido tumoral, superando algunas de las barreras fisiológicas que limitan la eficacia de los tratamientos tradicionales. Por ejemplo, se ha demostrado que NPs de 100-200 nm de tamaño se extravasan al tejido tumoral y quedan retenidas en él, pudiendo llevar a cabo su efecto terapéutico. Esto es especialmente importante para tumores sólidos que son difíciles de tratar debido a su estructura densa y su microambiente tumoral [1].

1.3. Métodos de entrega convencionales, efecto EPR y direccionamiento activo y caballos de troya

En los tratamientos oncológicos modernos, los métodos convencionales de entrega de fármacos a través de nanosistemas están diseñados para aumentar la concentración de los agentes terapéuticos en el tejido tumoral, atravesando diversas barreras biológicas como la pared vascular y el microambiente tumoral [8][13]. Existen dos enfoques principales para la acumulación de NPs en el tumor: el direccionamiento pasivo, basado en el efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR), y el direccionamiento activo, que utiliza ligandos específicos para aumentar la selectividad del tratamiento [14].

El efecto **EPR** aprovecha las características anormales del sistema vascular de los tumores, que presenta vasos sanguíneos irregulares y permeables, permitiendo que las NPs se acumulen de manera pasiva en el tejido tumoral [8][13][14]. Asimismo, la disfunción del sistema linfático en los tumores impide el drenaje adecuado, favoreciendo la retención prolongada de las NPs terapéuticas. Este mecanismo ha demostrado mejorar la eficacia terapéutica al aumentar la concentración del fármaco en el tumor y reducir los efectos tóxicos en tejidos sanos. Sin embargo, su efectividad varía dependiendo del grado de vascularización y permeabilidad del tumor, y la acumulación de las moléculas, fármacos o NPs terapéuticas sigue siendo muy baja y limitada (particularmente en aquellos tumores menos permeables o con alta presión osmótica). [13].

Por otro lado, el **direccionamiento activo** implica modificar la superficie de las NPs con ligandos específicos, tales como anticuerpos, péptidos, proteínas o aptámeros, que reconocen y se unen a receptores específicos en las células tumorales [7][8]. Este método aumenta la selectividad del tratamiento (comparado con el efecto pasivo EPR) y mejora la internalización de los fármacos en las células cancerosas, especialmente en terapias basadas en macromoléculas como ADN, ARN de silenciamiento (siARN) o proteínas. El éxito del direccionamiento activo depende de la correcta elección del ligando y de su compatibilidad con los receptores de la célula diana [14].

Finalmente, en los últimos años se está explorando un nuevo enfoque utilizando los conocidos como **"Caballos de Troya"** alternativo a los dos anteriores para vehiculizar productos derivados de la nanotecnología a tumores. El uso de esta estrategia de "Caballos de Troya" se refiere a la encapsulación de las NPs terapéuticas en células o vesículas naturales, lo que proporciona una barrera protectora que mejora la biodisponibilidad del fármaco, reduce el reconocimiento por parte del sistema inmunitario y aumenta su llegada al tumor. Un ejemplo de esta estrategia son los exosomas, pequeñas vesículas extracelulares (VEs) que pueden ser modificadas para transportar las NPs y dirigir las selectivamente hacia el tumor. Esta técnica ha demostrado ser eficaz en la mejora de la estabilidad y la eficiencia de la entrega de fármacos, mejorando los resultados terapéuticos [15].

El desarrollo de estrategias terapéuticas empleando estos Caballos de Troya para vehiculizar NPs a tumores, tiene el potencial de mejorar significativamente la eficacia de los tratamientos al maximizar la acumulación de fármacos en los tumores y minimizar los efectos adversos en los tejidos circundantes, presentándose como enfoques prometedores en la lucha contra la enfermedad.

1.4. Vesículas extracelulares y exosomas como vehículos de entrega:

La práctica totalidad de las células presentes en el organismo son capaces de secretar distintos tipos de VEs. Estas VEs son partículas con una doble bicapa lipídica de características similares a la de la membrana plasmática que varían en tamaño entre 50 y 1000 nm [1]. Estas vesículas son secretadas a los fluidos biológicos por diferentes tipos de células y varían en origen, tamaño y composición. Las VEs se dividen en tres clases principales: exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos [16]. Las VEs juegan un papel crucial en la comunicación intercelular al transportar una variedad de biomoléculas, como proteínas, lípidos y material genético (ARN y ADN), de una célula a otra.

Dentro de las VEs, los exosomas son vesículas esféricas de origen endocítico, con un diámetro que oscila entre los 20 y 150 nm [17]. Están rodeados por una bicapa fosfolipídica que comparte muchas características con la membrana plasmática de las células parentales de origen, aunque con algunas diferencias importantes. La membrana exosomal está enriquecida en lípidos específicos como la esfingomielina y las ceramidas, así como en glicerosfosfolípidos como la fosfatidilcolina, la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol [18].

En su interior, los exosomas transportan una amplia gama de moléculas bioactivas, tales como proteínas y material genético, incluyendo ARN mensajero (mARN), microARN (miARN) y, en algunos casos, ADN de doble y simple cadena, e incluso ADN mitocondrial. Además, su membrana está compuesta por lípidos específicos que contribuyen a la funcionalidad y estabilidad de los exosomas [18]. Esta carga molecular depende en gran medida del tipo de

célula de la que derivan los exosomas, aunque algunos componentes parecen estar conservados entre diferentes tipos de exosomas [19].

A nivel proteico, los exosomas contienen una serie de proteínas que reflejan su origen endosomal y biogénesis a partir de los cuerpos multivesiculares (MVBs). Entre estas proteínas se incluyen las tetraspaninas (CD9, CD63 y CD81), proteínas involucradas en el transporte y la fusión de membranas (como las anexinas y flotilinas), proteínas de choque térmico (como HSP70 y HSP90), y proteínas relacionadas con la presentación de antígenos [20]. Estos marcadores proteicos son fundamentales para la identificación y caracterización de los exosomas, y su presencia en la superficie exosomal permite diferenciarlos de otras VEs de naturaleza distinta. La **Figura 1** ilustra la composición y estructura de los exosomas.

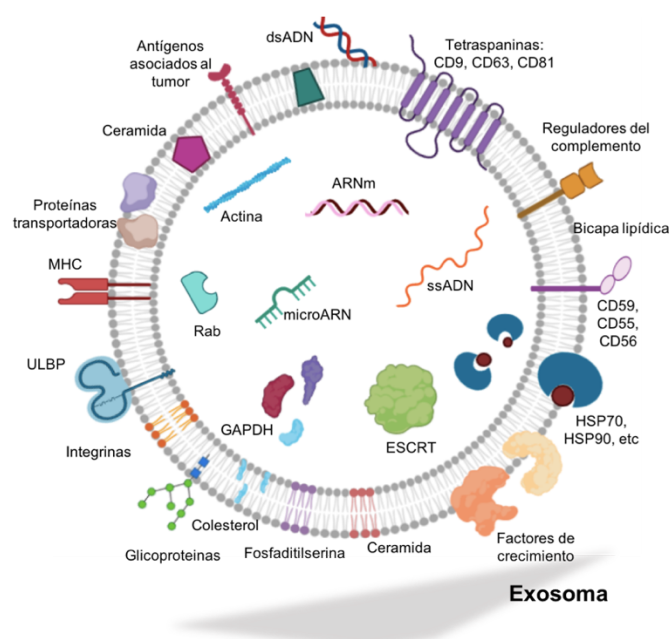


Figura 1. Composición y estructura de los exosomas. Adaptada de la tesis doctoral de Sancho, M. [21].

El uso de VEs, y en particular el uso de exosomas como vehículos de entrega selectivos de NPs se ha postulado recientemente como una estrategia prometedora en el tratamiento del cáncer. Las NPs combinadas con exosomas, en particular, han ganado mucha atención debido a que los lípidos y moléculas presentes en la superficie de los exosomas son muy similares a los de las células de origen. Esta similitud permite que los exosomas evadan la vigilancia del sistema inmunitario y se internalicen rápidamente dentro de las células cancerosas diana donde queremos dirigir las nanomedicinas. Además, una de las funciones principales de los exosomas es servir como vehículos de señalización y comunicación intercelular entre diferentes células diana. Como vehículos naturales, los exosomas han demostrado ser eficaces en la entrega de fármacos citotóxicos y otros agentes antitumorales hacia los sitios específicos del tumor. Además, pueden ser modificadas para mejorar su especificidad y capacidad de carga [1].

Sin embargo, a pesar de que el uso de VEs, y en particular de exosomas, como “Caballos de Troya” de NPs terapéuticas es un campo muy prometedor, todavía está en una fase poco desarrollada y algunos retos importantes tienen que solventarse. Entre ellos, es importante estudiar el comportamiento e interacciones de estos nuevos vectores en fluidos biológicos (formación de una capa superficial conocida como corona de proteínas (CP), estabilidad y agregación), el cual es aún desconocido y no ha sido estudiado en profundidad.

1.5. Papel fundamental e implicación de la corona de proteínas

Tras la administración sistémica de NPs, éstas se exponen a fluidos biológicos, especialmente en la sangre, donde existen miles de proteínas y moléculas que interactúan con las NPs. Estas interacciones provocan la adsorción de proteínas sobre la superficie de las NPs, lo que genera un complejo conocido como CP [22][23]. Este proceso cambia la identidad biológica de las NPs, ya que las proteínas adsorbidas pueden alterar sus propiedades fisicoquímicas, como el tamaño, la carga superficial, la solubilidad y la funcionalidad. Es este complejo NPs-proteínas, el que determinará cómo se comporta biológicamente, influyendo en aspectos como la captación celular, la biodistribución, el tiempo de circulación y la toxicidad [22].

La formación de la CP es un proceso dinámico que depende de las propiedades fisicoquímicas de las NPs (como el tamaño, la carga, los grupos funcionales superficiales y la forma) y del entorno en el que se encuentran, como la composición, la temperatura, el pH, la tensión de corte y el tiempo de exposición [23]. Inicialmente, las proteínas más abundantes en el medio se adsorben rápidamente a la superficie de las NPs, pero con el tiempo, las proteínas con mayor afinidad por la NPs reemplazan a las anteriores. Este fenómeno es conocido como el **efecto Vroman** [22].

La CP no es homogénea y se divide en dos capas principales: la **hard corona** y la **soft corona**. La **hard corona** está compuesta por proteínas de alta afinidad que se unen de forma irreversible a la superficie de las NPs. En contraste, la **soft corona** está formada por proteínas de baja afinidad que se unen de forma reversible, siendo más susceptibles al intercambio o al desprendimiento a lo largo del tiempo. Estas coronas se forman a través de interacciones no covalentes, como fuerzas electrostáticas y enlaces de hidrógeno, afectando la identidad de la CP a menudo limitada a las proteínas de la **hard corona** [23]. La **Figura 2** muestra un esquema de la formación de la CP y el intercambio de proteínas adsorbidas a lo largo del tiempo en un entorno biológico.

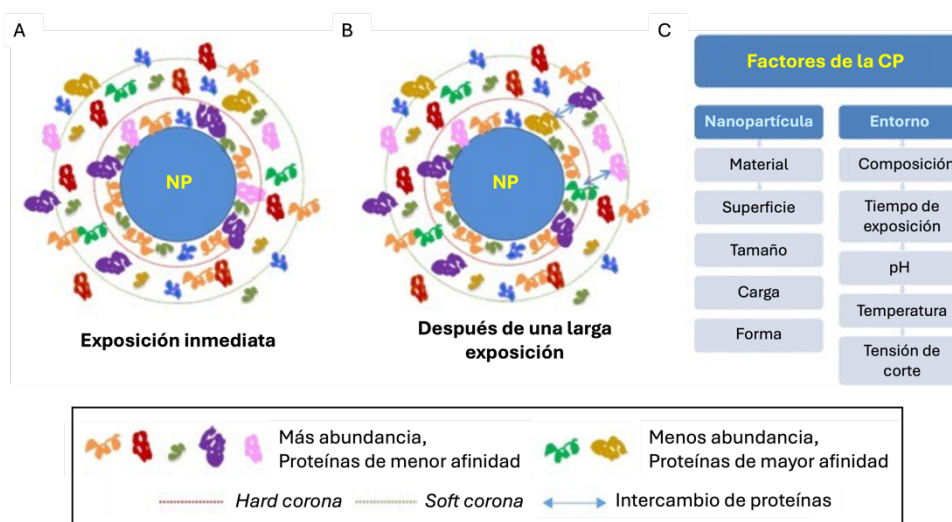


Figura 2. Formación de la CP e intercambio de proteínas adsorbidas a lo largo del tiempo en entornos biológicos. A) Inmediatamente después de la exposición. B) Después de un tiempo de exposición más prolongado, con desplazamiento de proteínas entre la hard corona, la soft corona y el entorno celular. C) Factores principales que afectan el patrón de la corona de proteínas divididos en dos propiedades categorizadas: nanopartículas y entorno. Adaptada de Nguyen, V.H et al. [22]

La CP modifica las propiedades fisicoquímicas de las NPs, influenciando su tamaño, carga y solubilidad, lo cual impacta en su biodistribución y capacidad para evadir el sistema inmunitario. La composición de la CP también juega un rol crucial en el reconocimiento y la internalización celular, ya que ciertas proteínas pueden actuar como ligandos para receptores específicos en células objetivo, facilitando la entrega dirigida. Además, la CP puede afectar la estabilidad de las NPs y la liberación de fármacos, protegiendo el agente terapéutico y permitiendo una liberación controlada en el sitio deseado [23]. Sin embargo, esta CP también puede afectar negativamente al comportamiento y a la actividad terapéuticas de las NPs de interés (puede promover la agregación de las NPs en circulación, así como la unión de opsoninas y proteínas de reconocimiento por parte del sistema inmunitario que promuevan la eliminación de las NPs suministradas) [24].

Considerando lo mencionado anteriormente, el papel y la implicación de la CP en el diseño de NPs terapéuticas y su vehiculización selectiva mediante exosomas necesita ser ampliamente estudiada. Entender cómo la CP modula las interacciones biológicas de estas NPs y los exosomas es crucial para optimizar su eficacia y minimizar efectos secundarios [25]. Además, es necesario desarrollar nuevas estrategias para combinar las NPs con los exosomas sin afectar a las moléculas de direccionamiento activo presentes en su membrana para evitar la formación de esta CP, y por tanto, maximizar su llegada al tumor.

Considerando todo lo anterior, es evidente que la combinación de nanotecnología y exosomas promete grandes avances en aplicaciones terapéuticas y diagnósticas. De hecho, existen más de 80 ensayos clínicos que emplean exosomas [26]. Sin embargo, la ausencia de métodos de purificación eficientes y de estrategias de carga de NPs terapéuticas en exosomas no invasivas, así como la falta de conocimiento que aún existe sobre las interacciones de los exosomas y de las NPs en sistemas biológicos (como por ejemplo la formación de esta CP), son importantes limitaciones que tienen que ser resueltas antes de trasladar este conocimiento desde los modelos animales al ámbito clínico.

2. OBJETIVO

El **objetivo principal** de este trabajo final de Máster es el estudio de factores clave que determinan el destino de los exosomas cargados con productos terapéuticos derivados de la nanotecnología, con el propósito de minimizar el reconocimiento y eliminación por el sistema inmunitario, y optimizar su entrega al tumor y su eficacia terapéutica. Para alcanzar este objetivo y considerando las limitaciones temporales de un trabajo de investigación de este tipo, se han planteado las siguientes tareas específicas:

1. Sintetizar y caracterizar fisicoquímicamente las NPs de diferentes metales sintetizadas sin recubrimientos orgánicos.
2. Aislar y caracterizar exosomas de células tumorales a partir de cultivos celulares.
3. Implementar una estrategia dirigida a encapsular eficazmente las NPs sintetizadas en los exosomas aislados.
4. Estudiar el comportamiento biológico y fisicoquímico de todos los nanomateriales sintetizados en este trabajo.

5. Evaluar la internalización y captura selectiva en células tumorales y macrófagos para determinar su capacidad de direccionamiento selectivo como agentes terapéuticos contra en cáncer.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Síntesis de nanopartículas mediante reducción en atmósfera de monóxido de carbono

La síntesis de las diferentes NPs se realizó siguiendo protocolos recientemente publicados por el grupo de investigación *Partículas y Películas Nanoestructuradas* (NFP), [27][28][29] y utilizando metodologías optimizadas por primera vez en este trabajo.

En concreto, se sintetizaron tres tipos diferentes de nanomateriales: nanoláminas de Pd (PdNSs), nanopartículas de Pt (PtNPs) y AuNPs. Para la síntesis de PdNSs, se preparó la disolución de crecimiento de paladio mezclando 11 mg de Na_2PdCl_4 , 30 mg de polivinilpirrolidona (PVP) (PM=55000) y 130 mg de KBr en 400 μL de agua Milli-Q. La disolución roja homogénea resultante se mezcló con 4 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) [30]. En el caso de la disolución de crecimiento de platino para sintetizar las PtNPs se preparó mezclando 5 mL de una disolución 2,5 mg/mL en Pt preparada a partir del ácido cloroplatínico (H_2PtCl_6 , 8 % pureza en H_2O , Mm=409,81 g/mol) con 25 mg de PVP (PM=55000). Por último, la disolución de crecimiento de oro para generar las AuNPs se preparó de igual manera, utilizando una disolución 2,5 mg/mL en Au, preparada a partir de ácido cloroáurico (HAuCl_4 , Mm=339,79 g/mol), pero se añadieron 50 mg de PVP, el doble de la cantidad utilizada en la disolución de platino.

En el caso de las AuNPs, además de PVP, se utilizaron otros estabilizantes para controlar las dimensiones y la morfología de las NPs sintetizadas: citrato y lisina. Para la preparación de la disolución de Au con citrato se basó en el método de Turkevich [31], aprovechando el carácter estabilizante y reductor a altas temperaturas que posee el citrato. Sin embargo, en este caso, el citrato se utilizó únicamente como estabilizante, ya que la reducción se llevó a cabo con el gas CO a temperatura ambiente. La disolución se preparó añadiendo HAuCl_4 1 mM con citrato de sodio 38,8 mM en diferentes proporciones Au/Cit. Para la disolución de Au con lisina, se preparó una disolución acuosa 0,4 mM de ácido cloroáurico con una proporción molar $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{Au}$ de 5,5. Se mantuvo en agitación toda la noche en la oscuridad para favorecer la hidrólisis de los enlaces Au-Cl y para la formación del complejo soluble de hidróxido de oro $[\text{Au}(\text{OH})_4]^-$. Posteriormente, se añadió lisina en diferentes proporciones Au/Lys [32]. Las proporciones de ambos estabilizantes se muestran en la **tabla 1**.

Tabla 1. Proporciones molares de Au/Cit y Au/Lys utilizados como estabilizantes.

	Proporciones molares		
Au/Cit	1:4	1:10	
Au/Lys	1:2	1:45	1:180

Las disoluciones precursoras de las diferentes NPs se sometieron a un proceso de reducción en una atmósfera controlada de monóxido de carbono (CO). Este paso crítico permite la formación de las NPs a partir de los iones metálicos presentes en las disoluciones. El proceso de reducción se llevó a cabo bajo condiciones específicas de temperatura y tiempo, optimizadas para cada tipo de NPs. Para ello, se colocaron en un reactor de acero inoxidable de alta presión

revestido de teflón. Se introdujo gas CO en el reactor para reducir los precursores y controlar la forma anisotrópica de las nanoestructuras [28]. La presión dentro del reactor se mantuvo a 6 bar. Para las disoluciones de Pd y Pt, el reactor se colocó en un baño de agua caliente (80°C durante 40 min), mientras que para la disolución de Au, el reactor se colocó en un baño de agua a temperatura ambiente (25°C durante 40 min). Las disoluciones se agitaron suavemente con una pulga magnética ubicada dentro del reactor. Las PdNSs se aislaron por centrifugación (10000 g, 10 min) mezclando el coloide azul oscuro con acetona en una relación de volumen de 1 a 3. Finalmente, las PdNSs se dispersaron en agua Milli-Q y se almacenaron a 5°C para su uso posterior. Las PtNPs y las AuNPs no necesitaron un tratamiento adicional y se obtuvieron directamente del reactor [30].

3.2. Caracterización fisicoquímica de las diferentes nanopartículas.

Las propiedades ópticas y fisicoquímicas así como la morfología de las diferentes NPs se caracterizaron utilizando las siguientes técnicas:

- **Dispersión dinámica de la luz (DLS) y Potencial Z:** se usa para obtener información sobre la distribución del tamaño hidrodinámico y sobre la carga superficial (potencial zeta) del material sintetizado a partir de la luz dispersada por el mismo. Permite analizar partículas en un amplio rango de tamaños, desde 0,3 nm hasta 10000 nm. Se ha utilizado un equipo Brookhaven 90 plus y el software ZetaPALS (Brookhaven Instruments Co.) para medir la carga superficial de las partículas disueltas en agua a pH= 7 [21].
- **Espectroscopía de emisión atómica con plasma de microondas (MP-AES):** Sirve para cuantificar la cantidad de un elemento presente en una muestra. En particular, permite realizar un análisis de metales, metaloides y no metales hasta niveles de µg/L. Para determinar la cantidad de cada uno de los metales presentes en las NPs sintetizadas y en las VEs cargadas con los diferentes metales 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. El análisis por MP-AES de todas las muestras requirió un tratamiento previo de digestión con agua regia ($\text{HNO}_3 + 3\text{HCl}$) seguido de una filtración con un filtro de 0,22 µm antes de ser analizadas. La recta de calibrado se realizó con patrones de Pd, Pt y Au con concentraciones desde 10 a 0 ppm [21].
- **Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR):** Se utilizó para obtener información estructural y la huella molecular de los componentes presentes en las NPs sintetizadas. 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. El espectro se analizó manualmente y todos los picos se identificaron en base a la base de datos FT-IR de NIST [21].
- **Espectrofotometría ultravioleta visible (UV-Vis):** los espectros UV-Vis se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro UV-VIS V-670 de Jasco. El patrón de absorbancia en la región UV-Vis y en el espectro de infrarrojo cercano (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 interactuar 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) [33]. 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 [21].

- **Microscopía electrónica de transmisión (TEM):** Se adquirieron micrografías de las NPs utilizando un microscopio T20-FEI Tecnai que 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 la funcionalización de las partículas con los diferentes estabilizantes, así como evaluar su presencia en el interior de las VEs, se utilizó ácido fosfotúngstico (PTA) al 3 % como agente de contraste. El tamaño de partícula y la distribución del tamaño de cada muestra se obtuvieron mediante análisis de imagen usando ImageJ. Posteriormente, con el programa estadístico OriginPro®, se calcularon las frecuencias relativas y la distribución de tamaños [21].

3.3. Líneas celulares

3.3.1. Mantenimiento

Como se observa en la **tabla 2**, las células con las que se ha trabajado son U251-MG (células tumorales de glioblastoma humano) y RAW 264.7 (macrófagos murinos). El medio de cultivo empleado (Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) 4,5 glucosa) se suministró por Sigma Aldrich. Este medio se suplementó con suero fetal bovino (FBS) obtenido de Gibco, así como con dos antibióticos (penicilina y estreptomycin) y un antifúngico (anfotericina), proporcionados por Biowest. Todas las líneas celulares se manipularon en una campana de flujo laminar vertical, bajo condiciones estériles. Además, se testaron de micoplasma mensualmente.

Tabla 2. Líneas celulares utilizadas, medio de cultivo, suplementos y condiciones de crecimiento empleadas [21].

Línea celular	Origen	Medio de cultivo	Suplementos	Condiciones crecimiento
U251-MG	Glioblastoma humana	DMEM 4,5 g/L glucosa	1 % Penicilina/ Estreptomycin/Anfotericina 10% FBS	37°C, normoxia (5 % CO ₂)
RAW 264.7	Macrófagos murinos	DMEM 4,5 g/L glucosa	1 % Penicilina/ Estreptomycin/Anfotericina 10% FBS	37°C, normoxia (5 % CO ₂)

3.3.2. Congelación y descongelación

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 compuesto por proporción

FBS:DMSO 90:10 v:v. El dimetilsulfóxido (DMSO) actúa como agente preservante, impidiendo la formación de cristales en la membrana plasmática de las células. El proceso de congelación se realizó en crioviales de manera gradual: primero, se mantuvieron 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, se invirtió el proceso anterior. 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 cultivo, se realizó un lavado durante 5 minutos a 300 g para eliminar los restos de DMSO del medio de congelación. Transcurridas 24 horas de su siembra, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco.

3.4. Aislamiento de exosomas por ultracentrifugación

3.4.1. Obtención del medio Ultracen

Para purificar los exosomas producidos por células U251-MG, se mantuvieron en crecimiento bajo condiciones óptimas (37°C, normoxia (5 % CO₂)). El medio empleado se enriqueció con FBS sin exosomas, denominado ULTRACEN. Para eliminar los exosomas presentes naturalmente en el FBS, se ultracentrifugó durante la noche (12 horas), a 100000 g y a 4°C.

3.4.2. Aislamiento de exosomas

Las células U251-MG se cultivaron como descrito anteriormente en placas p100 hasta alcanzar un 80 % de confluencia en su medio y condiciones de cultivo correspondientes. Posteriormente, el medio de cultivo se reemplazó por medio ULTRACEN (suplementado con los antibióticos y antifúngicos y con FBS libre de exosomas) para garantizar un medio libre de exosomas. Las células se incubaron durante 48 horas más con este medio antes de proceder a la purificación de los exosomas secretados. Los exosomas se aislaron y purificaron mediante ciclos sucesivos de ultracentrifugación a partir de sobrenadantes de cultivo celular en confluencia siguiendo un procedimiento previamente desarrollado [34]. El protocolo de aislamiento se esquematiza en la **Figura 3**.

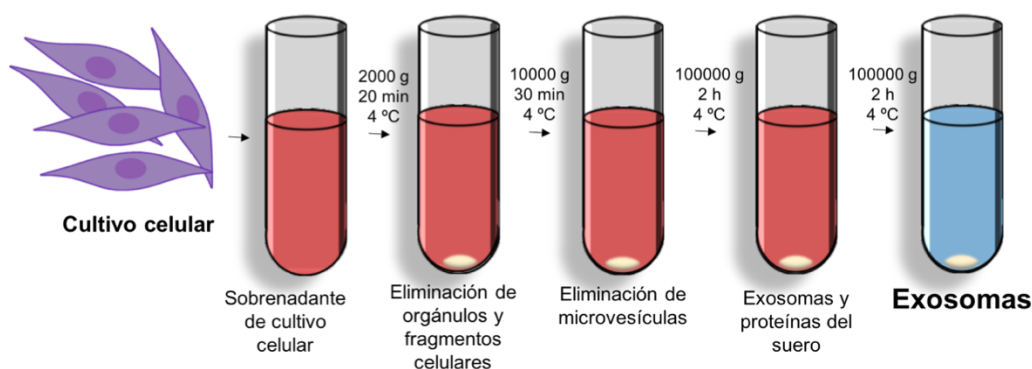


Figura 3. Esquema del proceso de aislamiento de los exosomas a partir de cultivos celulares siguiendo un método basado en rondas sucesivas de ultracentrifugación. Adaptada de la tesis doctoral de Sancho, M. [21].

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. Se descartó el *pellet*, y el sobrenadante obtenido se sometió a una segunda centrifugación a 10000 g durante 30 minutos

a 4°C, eliminando así las microvesículas de mayor tamaño presentes en la muestra. 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. Para eliminar las proteínas séricas, el *pellet* de exosomas se lavó en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) mediante otra ronda de ultracentrifugación (100000 g durante 2 h a 4°C). Finalmente, el *pellet* de exosomas se resuspendió en PBS y se almacenó para su posterior análisis.

3.5. Caracterización de los exosomas

Tras el aislamiento de los exosomas, estos se caracterizaron por diferentes métodos fisicoquímicos para verificar la correcta morfología y funcionalidad de estos. En concreto, se usaron las siguientes técnicas: cuantificación de proteína total por BCA (ácido bicinonínico), TEM (explicada en la **sección 3.2**), análisis de rastreo de nanopartículas (NTA), potencial Z y análisis multiplex MACSPlex EV por citometría de flujo.

- **Cuantificación de proteína total por BCA:** Se empleó para determinar la concentración de los exosomas en forma de proteína total. (Kit de ensayo de proteínas BCA de microplacas Pierce™ (Thermo Scientific™)). Este ensayo se fundamenta en la formación de un complejo proteína Cu^{2+} , seguido de la reducción del Cu^{2+} a Cu^+ en condiciones alcalinas. 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 BCA (reactivo cromogénico) se une específicamente al Cu^+ formando un complejo estable de color azulado-morado, que absorbe a 562 nm. La lectura de la absorbancia a 562 nm utilizando un lector de placas Synergy HT es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la disolución (obtenida con una recta patrón de estándares de concentración conocida) [35].
- **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. Se utilizó un equipo Nanosight NS500 (Malvern Panalytical) para evaluar el tamaño de los exosomas en presencia y en ausencia de NPs en PBS a pH=7 [36].
- **Análisis multiplex MACSPlex EV por citometría de flujo:** Esta técnica combina los inmunoensayos tradicionales (ELISA) con la citometría de flujo mediante la inmovilización de anticuerpos en microesferas de látex coloreadas. Permite el análisis simultáneo de hasta 30 proteínas características de exosomas y en este trabajo se empleó para determinar su expresión en ausencia y en presencia de las NPs. Se utilizó el Kit MACSPlex EV (Miltenyi Biotec) siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante y el citómetro analizador Gallios (Beckman Coulter) [37].

3.6. Generación in-situ de nanopartículas en el interior de los exosomas.

3.6.1. Incubación de los exosomas con precursores metálicos

La generación *in situ* de las NPs de los diferentes metales en el interior de los exosomas se llevó a cabo siguiendo un novedoso proceso publicado recientemente por el grupo NFP donde se ha realizado este proyecto [27][34]. Si bien, estos protocolos han sido escalados y/o modificados a lo largo del trabajo. Los precursores iónicos descritos en la **sección 3.1** se incubaron con los exosomas permitiendo su incorporación al interior de estos por difusión pasiva a través de sus membranas, a temperatura ambiente y sin agitación durante 12 h. La diferencia de concentración de la sal precursora fuera y dentro del exosoma actuó como fuerza impulsora

trasladando estos iones al interior de los exosomas 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, se tomó un volumen que contenga 30 μg de exosomas (según la concentración en microgramos por mililitro determinada con el kit BCA descrito anteriormente) y se resuspendieron en 30 mL de PBS con el precursor metálico a 0,06 nM. La disolución se incubó durante 12 h a temperatura ambiente sin agitación magnética para minimizar la agregación de las vesículas. A continuación, los exosomas cargados con los precursores metálicos se aislaron por ultracentrifugación a 100000 g durante 2 h a 4°C y se descartó el sobrenadante, que contenía el precursor metálico no internalizado. Finalmente, los exosomas cargados se resuspendieron en 1 mL de PBS para ser posteriormente tratados con el CO y así generar la reducción de los precursores iónicos dando lugar a la formación de las nanoestructuras metálicas en su interior.

3.6.2. Generación de nanopartículas por reducción con monóxido de carbono

Es importante señalar que el CO está catalogado como un gas altamente inflamable, incoloro, inodoro, insípido y extremadamente tóxico debido a su capacidad de unirse a la mioglobina y a la citocromo oxidasa mitocondrial [38]. Este gas se combina fácilmente con la hemoglobina, formando carboxihemoglobina, lo que puede provocar estrés hipóxico al reducir el transporte de oxígeno en la sangre [39]. 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 [40]. Por este motivo, la manipulación del CO se llevó a cabo con las medidas de seguridad adecuadas y en presencia de un detector de CO con una alarma configurada según los límites permitidos de CO. La **Figura 4** ilustra el sistema experimental utilizado.

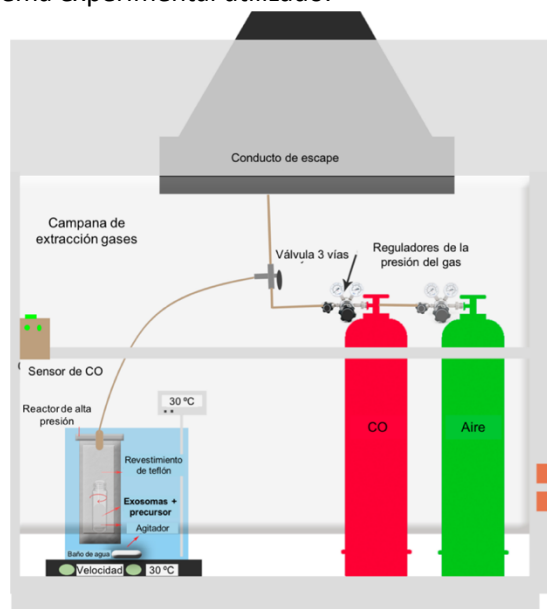


Figura 4. Ilustración de la campana de extracción de gases que contiene el autoclave recubierto con teflón, dentro del cual se encuentra el vial con los exosomas cargados con los precursores metálicos. El esquema también muestra las botellas de CO y aire conectadas a una llave de tres vías para llevar a cabo la reducción de los precursores iónicos localizados en el interior de los exosomas. Adaptada de Sebastián, V. et al [34].

Para llevar a cabo la reacción, el vial con la disolución de exosomas cargados con iones metálicos en su interior (en 1 mL de PBS) se introdujo dentro de un reactor de alta presión (autoclave) revestido de teflón. Se incorporó CO gradualmente 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 colocó en un baño de agua a 25°C con agitación para asegurar una temperatura homogénea. Una vez alcanzada una presión de 6 bar de CO, el reactor se mantuvo en esta atmósfera reductora a 30°C durante 40 minutos para la conversión de los iones metálicos a su correspondiente especie reducida en forma de nanopartícula. Transcurrido este tiempo, se introdujo aire en el interior del reactor para desorber el CO con el doble propósito de detener la reacción química y garantizar una manipulación segura del reactor al ser abierto para extraer el vial con los exosomas cargados con NPs [34].

3.7. Caracterización biológica de los exosomas con las nanopartículas en su interior.

Tras la síntesis de las correspondientes NPs en el interior de los exosomas, estos se caracterizaron por una batería de métodos fisicoquímicos y biológicos (detallados en las **secciones 3.2 y 3.5**) para 1) caracterizar las dimensiones y morfología de las NPs generadas en su interior y 2) verificar la correcta morfología y funcionalidad de los exosomas cargados con las NPs. En concreto, se usaron las siguientes técnicas: NTA, potencial Z, UV-Vis, TEM, MP-AES y análisis multiplex MACSPlex EV por citometría de flujo.

3.8. Estudios de corona de proteínas, estudios de agregación y estabilidad en fluidos biológicos.

3.8.1. Proceso de generación de la corona de proteínas en las nanopartículas en contacto con DMEM

Para estudiar la evolución de la CP a lo largo del tiempo, se diseñó un protocolo en el que las muestras de NPs sin encapsular se pusieron en contacto con medio de cultivo DMEM (suplementado con 10 % de FBS) durante distintos intervalos de tiempo. Esto permitió que las proteínas del medio se agregaran gradualmente, formando la conocida CP alrededor de las NPs. Las muestras se prepararon por triplicado. Primero, en un tubo Eppendorf se añadieron 500 µL de DMEM junto con el volumen necesario de NPs para alcanzar una concentración de 0,02 mg/mL de Au o 0,01 mg/mL de Pd o Pt (obtenidos a partir de los datos de MP-AES). Las muestras se dejaron en contacto durante intervalos de tiempo establecidos: 5 minutos, 4 horas y 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo correspondiente, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a máxima velocidad (16000 g, 10 min) para descartar las moléculas y proteínas no adheridas a las NPs. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se añadieron 500 µL de PBS para lavar las muestras y eliminar cualquier residuo. Las muestras se centrifugaron nuevamente a máxima velocidad (16000 g, 10 min). Finalmente, se retiró el sobrenadante y se recogió el *pellet*, que contenía las NPs con la CP generada en su superficie para ser analizada. Este proceso permitió observar 1) la evolución de la composición proteica de la CP a lo largo del tiempo, 2) como las diferentes nanoestructuras generadas tenían CP diferentes y 3) la estabilidad y agregación de las NPs.

3.8.2. Proceso de generación de la corona de proteínas en los exosomas en contacto con DMEM

Al igual que con las NPs, se realizó un estudio para analizar la formación de la CP en los exosomas (tanto vacíos como cargados con las diferentes nanoestructuras). El procedimiento seguido fue similar al descrito anteriormente, aunque adaptado para los exosomas. En este caso, se incluyeron muestras control, que no tuvieron contacto con DMEM, así como muestras de exosomas vacíos en contacto con DMEM durante 4 horas y 24 horas, respectivamente para valorar si la presencia de las NPs afectaba también a la formación de la CP en los exosomas sin modificar con las nanoestructuras.

El proceso comenzó con la incubación de los exosomas derivados de células U251-MG (Exos^{U251-MG}) en DMEM. Para ello, se mezclaron 330 μ L de Exos^{U251-MG} con 500 μ L de DMEM y se dejó la mezcla en agitación durante el tiempo establecido. Posteriormente, se procedió a la ultracentrifugación de las muestras a 100000 g durante 2 horas a 4°C. Posteriormente, se decantaron al máximo los tubos (descartando el sobrenadante con las proteínas no unidas) y los pellets de los Exos^{U251-MG} con la correspondiente CP formada se almacenaron hasta su posterior análisis. Para precipitar y concentrar los exosomas purificados antes de analizar su CP, se añadió acetona (1:1, v/v) y se dejó la mezcla en reposo durante 24 h a -20°C. Pasado este tiempo, se centrifugaron las muestras durante 30 minutos a máxima velocidad (16000 g). La acetona se eliminó cuidadosamente, y los tubos se dejaron secar al aire. Posteriormente, se añadieron 12 μ L de PBS para resuspender el *pellet* y la muestra se dividió en dos partes: 6 μ L se reservaron para pruebas de caracterización por métodos fisicoquímicos, y los restantes 6 μ L se utilizaron para electroforesis y análisis por proteómica. Este proceso permitió estudiar como la presencia de los exosomas alrededor de las NPs determinaba y afectaba a la formación de esta CP así como su variación a lo largo del tiempo.

3.8.3. Caracterización de la corona de proteínas

Para caracterizar la CP formada alrededor de las NPs sin encapsular o cargadas en el interior de exosomas (en términos de parámetros fisicoquímicos), se emplearon algunas de las técnicas ya descritas ampliamente en las secciones anteriores (NTA y potencial zeta). Además, se determinó también la composición proteica de esta CP formada por tres técnicas de proteómica:

- **Electroforesis Gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE):** Se utilizó para separar proteínas y otras macromoléculas por su movilidad electroforética. El *pellet* final de exosomas se resuspendió en PBS como mencionado anteriormente y se incubó con LaemmlyTM en proporción (5:1 v/v). Las muestras se calentaron durante 10 minutos a 95°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. Dicho gel se sintetizó con dodecil sulfato sódico (SDS) formado a su vez por dos partes: 1) un gel concentrador al 5 % de acrilamida y 2) un gel inferior separador al 12 % de acrilamida. Las **tablas A.2 y A.3 del anexo 2** recogen los reactivos empleados en la síntesis de los geles concentrador y separador, respectivamente. Tras cargar las muestras en el gel (25 μ g de proteína total para los exosomas y la masa equivalente de metal contenida en los exosomas para las NPs sin encapsular), 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. Una vez separadas las proteínas se procedió a dos

análisis diferentes: 1) escanear el gel para semicuantificar la cantidad de proteínas con el software ImageJ y Origin y 2) recortar, con ayuda de un bisturí, las bandas observadas para identificarlas por espectrometría de masas.

- **Espectrometría de masas:** Una vez recortadas las muestras, estas se llevaron al Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA) al Servicio Científico Técnico del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS) para la identificación de las proteínas por espectrometría de masas de alta resolución y movilidad iónica. Se empleó un espectrómetro de masas de alta resolución y movilidad iónica TIMS TOF Flex (Bruker Daltonics), acoplado en línea a un cromatógrafo líquido EvoSep ONE (EvoSep).
- **Análisis bioinformático:** Tras la identificación de las proteínas presentes en los geles SDS-PAGE mediante espectroscopia de masas, el grupo colaborador de este TFM, ubicado en el Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI) y liderado por el Dr. Joaquín Sanz, llevó a cabo un análisis bioinformático para caracterizar en profundidad los perfiles proteicos y evaluar las diferencias entre los diferentes tipos de NPs y exosomas y las condiciones experimentales testadas. El primer paso en el análisis consistió en un control de calidad de los datos obtenidos, con el objetivo de asegurar la reproducibilidad de los datos obtenidos en los diferentes replicados. Una vez validados los datos, se realizó un análisis de componentes principales (PCAs). El PCAs permitió visualizar las relaciones entre las muestras en un espacio de menor dimensión, identificando las diferencias y similitudes entre los perfiles proteicos de las distintas NPs y exosomas bajo las condiciones experimentales estudiadas. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis de expresión diferencial (DE) de las proteínas. Este paso fue crucial para identificar y cuantificar las diferencias en los perfiles de expresión proteica asociados a las distintas condiciones experimentales. Finalmente, se generaron diagramas de Venn para comparar las proteínas comunes y exclusivas entre las diferentes NPs y exosomas. Estos diagramas se construyeron para distintos niveles de expresión (50%, 75% y 90%) y permitieron visualizar las intersecciones entre las proteínas identificadas en las distintas condiciones así como su clasificación en diferentes familias de proteínas.

3.9. Estudio de internalización y captura selectiva

La capacidad de internalización de los diferentes nanomateriales empleados a lo largo este trabajo (tanto en forma libre como encapsulados en exosomas), así como la implicación de la CP en su distribución y vehiculización en el interior celular, se evaluó por microscopía confocal y por MP-AES. El proceso de internalización de NPs y exosomas se evaluó en dos líneas celulares: células diana tumorales U251-MG y macrófagos RAW 264.7. Para ello, se prepararon muestras por duplicado, destinando unas para un análisis cualitativo por fluorescencia mediante microscopía confocal y otras para la cuantificación de la cantidad de metal internalizado mediante MP-AES.

3.9.1. Experimentos de microscopía confocal

En primer lugar, ambas líneas celulares se sembraron sobre un cubreobjetos de 20 mm (previamente dispuesto en una placa de 24 pocillos) a una densidad de 30000 células por pocillo y se cultivaron durante 24 h.

A continuación, se añadieron las NPs de interés y se mantuvieron en contacto durante diferentes tiempos en función del estudio a realizar. En concreto, se añadió una cantidad de 0,3

µg de metal/pocillo (tanto de forma libre como encapsulada en el interior de los exosomas) y se incubaron durante 2, 6 y 24 horas. 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 una tinción de diferentes estructuras subcelulares.

Para ello, en primer lugar se ensambló la cámara húmeda y 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 estas. La faloidina (para marcar los filamentos de actina del citoplasma de las células, λ_{ex} : 556 nm y λ_{em} 570 nm) se diluyó en PBS-BSA-saponina a concentración 1/200, y se puso 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 (dH₂O) y se montaron sobre portaobjetos con 5 µL de medio de montaje Fluoromont-G conteniendo Hoechst 33342 (λ_{ex} : 350 nm y λ_{em} 461 nm) para marcar los núcleos. En último lugar, se dejaron secar los cubreobjetos antes de sellarse. Las NPs se visualizaron directamente por reflexión de la luz incidente. Las muestras se visualizaron en un microscopio confocal perteneciente al IACS: microscopio confocal espectral Zeiss LSM 880 con Airyscan utilizando un objetivo de aceite de inmersión 63 x/ N.A. 1.40). 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.

3.9.2. Espectroscopía de emisión atómica con plasma de microondas

La cantidad de partículas y/o exosomas cargados con NPs presentes dentro de las células se cuantificó por MP-AES mediante la determinación del contenido de Au, Pd o Pt como se ha descrito anteriormente. 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) durante 48 h. Posteriormente, se filtraron con un filtro de 0,22 µm antes de ser analizadas. La recta de calibrado se realizó con patrones de Pd, Pt y Au con concentraciones desde 20 a 80 ppm.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas

4.1.1. Nanoláminas de Pd

En la síntesis de las PdNSs usando CO como agente reductor, se obtuvieron nanoláminas (NSs) ultrafinas de Pd. En la **Figura 5 A** se presentan las imágenes obtenidas mediante TEM de las PdNSs, con una ampliación para resaltar detalles estructurales. La **Figura 5 B** incluye un histograma de distribución de tamaño de las diferentes PdNSs obtenido a partir de las imágenes de TEM, lo que permite observar la homogeneidad y el rango de tamaños de las NSs sintetizadas. El tamaño medio obtenido para las PdNSs fue de $47,2 \pm 7,1$ nm. También se estudió la carga superficial de las PdNSs, obteniéndose una carga superficial negativa con un valor de $-4,49 \pm 1,47$ mV.

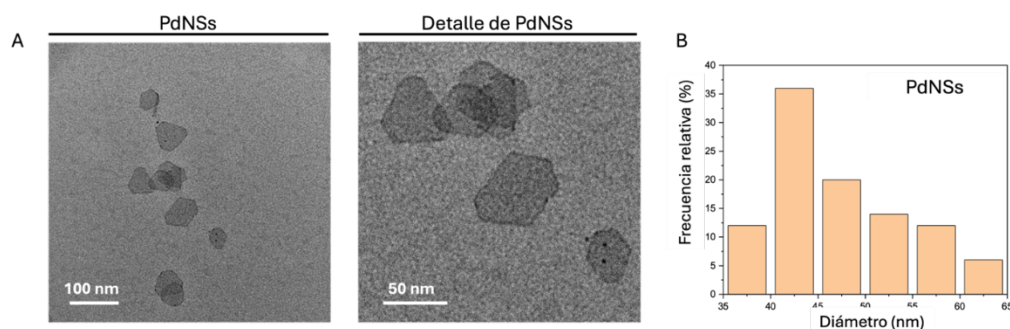


Figura 5. A) Fotografías de TEM de PdNSs después del tratamiento con CO y detalle de estas. B) Histograma de distribución de tamaños de las PdNSs.

La **Figura 6 A** muestra el espectro de UV-Vis de las PdNSs, con un pico máximo de absorbancia en la región del NIR, concretamente alrededor de 957 nm. Estos resultados confirman el efecto SPR correspondiente a la morfología y geometría de estas PdNSs. Este efecto SPR 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 [33]. En este caso, es crucial obtener dispersiones de NSs 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. Además, las PdNSs con un máximo en esta región son catalizadores bioortogonales para generar moléculas con actividad antitumoral en el interior de las células cancerosas [27][41]. 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 extraordinarias [42][43][44][45]. De hecho, se ha descrito el uso de CO para sintetizar PdNSs de menos de 10 capas atómicas con una longitud 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 [28].

La **Figura 6 B** muestra el espectro de FTIR proporcionando información sobre los grupos funcionales presentes en la superficie de las PdNSs. Se pueden observar algunos de los picos característicos del estabilizante empleado durante la síntesis (PVP) (grupo carbonilo (C=O) a $1660-1690\text{ cm}^{-1}$ y enlaces C-N del anillo de pirrolidina entre $1200-1350\text{ cm}^{-1}$). Los datos obtenidos van en concordancia con resultados previos publicados en bibliografía [28].

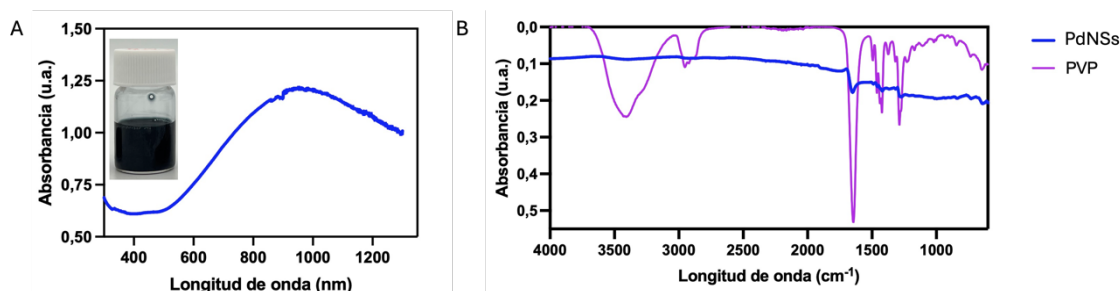


Figura 6. A) Espectro de absorción UV-Vis de las PdNSs, mostrando un pico de absorción máximo a aproximadamente a 957 nm. B) Espectro FTIR del PVP y de las PdNSs.

4.1.2. Nanopartículas de Pt

En la **Figura 7 A** se presentan las imágenes de TEM a diversos aumentos de las PtNPs, observándose NPs esféricas ultrapequeñas. La **Figura 7 B** incluye un diagrama de distribución de tamaño de las diferentes PtNPs obtenido a partir de las microfotografías de TEM. Se puede observar una distribución de tamaños homogénea con un diámetro medio de $1,5 \pm 0,3$ nm. También se estudió la carga superficial de las PtNPs, obteniéndose de nuevo un valor de $-5,71 \pm 0,47$ mV.

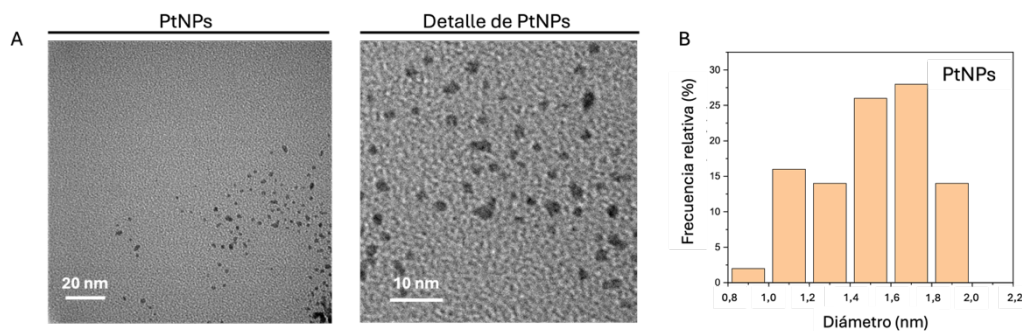


Figura 7. A) Fotografías de TEM de PtNPs después del tratamiento con CO y detalle de estas. B) Histograma de distribución de tamaños de las PtNPs.

Los espectros de FTIR del PVP (estabilizante usado durante la síntesis) así como de las PtNPs generadas se muestran en la **Figura 8**. Al igual que en el caso de las PdNSs, puede observarse como el espectro de las PtNPs se asemeja al del PVP puro. En concreto, se pueden ver algunos de los picos característicos de dicho estabilizante (p.ej. grupo carbonilo (C=O) a 1660-1690 cm⁻¹ y enlaces C-N del anillo de pirrolidina entre 1200-1350 cm⁻¹). También se puede apreciar la señal de los enlaces N-H del anillo de pirrolidina entorno a 3300-3500 cm⁻¹.

Finalmente, las propiedades ópticas de las PtNPs se caracterizaron también por UV-Vis. En este caso, las PtNPs de 1,5 nm no exhibieron picos máximos de absorción a ninguna longitud de onda ya que este material no genera ningún plasmón de superficie [46].

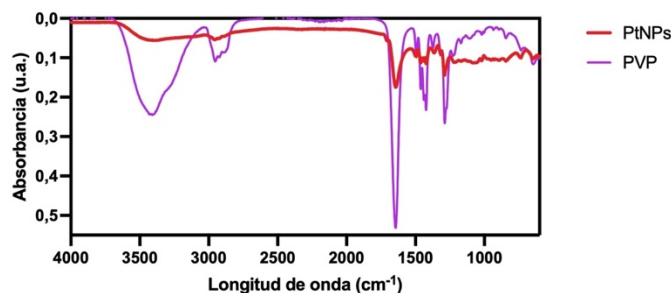


Figura 8. Espectro FTIR del PVP y de las PtNPs.

4.1.3. Nanopartículas de Au

En la **Figura 9 A** se muestran las imágenes de TEM de las AuNPs sintetizadas, con una ampliación para resaltar detalles estructurales en la que se aprecian morfologías heterogéneas e irregulares. En la **Figura 9 B** se incluye un gráfico de distribución de tamaño de las AuNPs basado en los resultados obtenidos mediante TEM. El tamaño promedio calculado para estas NPs fue de $28,6 \pm 5,6$ nm. Asimismo, se llevó a cabo un análisis de la carga superficial de las AuNPs, obteniéndose un valor de $-13,67 \pm 1,56$ mV.

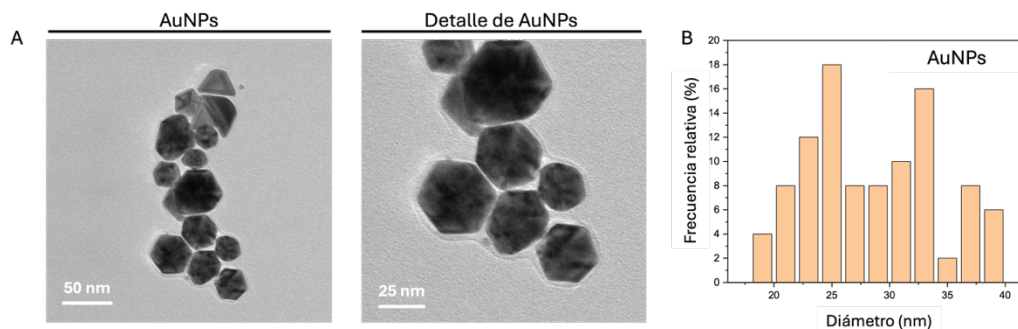


Figura 9. A) Fotografías de TEM de AuNPs después del tratamiento con CO y detalle de estas. B) Histograma de distribución de tamaños de las AuNPs.

La **Figura 10 A** muestra el espectro de UV-Vis de las AuNPs, con dos picos máximos de absorbancia en la región del visible, concretamente alrededor de 545 nm y 690 nm, indicando la heterogeneidad de las AuNPs sintetizadas. La **Figura 10 B** muestra el espectro de FTIR proporcionando información sobre los grupos funcionales presentes en la superficie de las AuNPs. Se pueden ver algunos de los picos característicos del estabilizante, como por ejemplo el carbonilo (C=O) entorno a $1660-1690\text{ cm}^{-1}$ y los enlaces C-N del anillo de pirrolidina entre $1200-1350\text{ cm}^{-1}$.

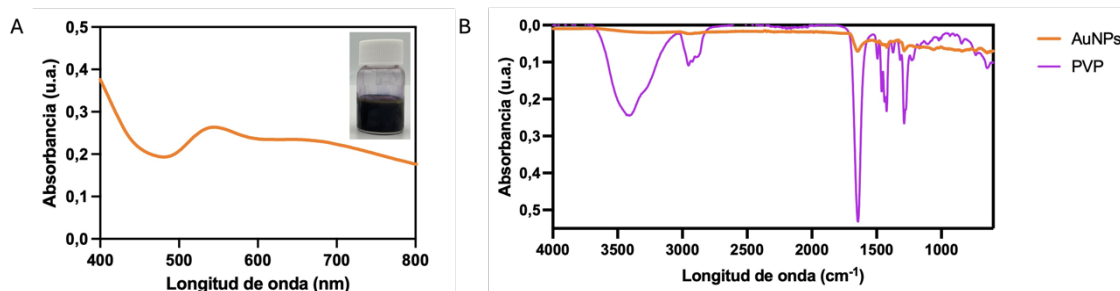


Figura 10. A) Espectro de absorción UV-Vis de las AuNPs, mostrando dos picos de absorbancia a aproximadamente a 545 y 690 nm. B) Espectro FTIR del PVP y de las AuNPs.

Sin embargo, como se demuestra en las **Figura 9 y 10**, a pesar de haber utilizado el doble de cantidad de PVP (comparado con la cantidad empleada para sintetizar la PdNSs y las PtNPs) para intentar estabilizar las AuNPs, no resultó suficiente para lograr la estabilización deseada (se obtuvo una población de AuNPs muy heterogénea en tamaño y morfología). Por lo tanto, se exploraron otros estabilizantes alternativos con el objetivo de obtener AuNPs más estables y homogéneas.

En primer lugar, se sintetizaron AuNPs utilizando citrato de sodio como estabilizante (AuCit NPs), basándose el método de Turkevich [31]. Se probaron dos relaciones molares diferentes (como se detalla en la **sección 3.1**), optando por la relación más alta. Esto se debe a

que, como se indica en bibliografía [31], un mayor exceso molar de citrato en relación con el oro favorece la disminución del tamaño de las partículas, así como una menor polidispersión, dando lugar a NPs más homogéneas, que es precisamente el objetivo buscado.

En la **Figura 11 A** se observan imágenes de TEM que muestran las AuCit NPs, destacando sus características estructurales con una ampliación. Como se muestra en la **Figura 11 B**, el gráfico de distribución de tamaño de las diferentes AuCit NPs, revela una morfología esférica con una notable homogeneidad en el rango de las partículas obtenidas. Esto se atribuye a la elección de una mayor relación molar entre el oro y el citrato, ya que, como descrito anteriormente [31], este exceso de citrato favorece la síntesis de partículas más pequeñas y uniformes. El diámetro medio obtenido para las AuCit NPs fue de $5,1 \pm 0,9$ nm y la carga superficial de las AuCit NPs fue de $-17,99 \pm 0,81$ mV.

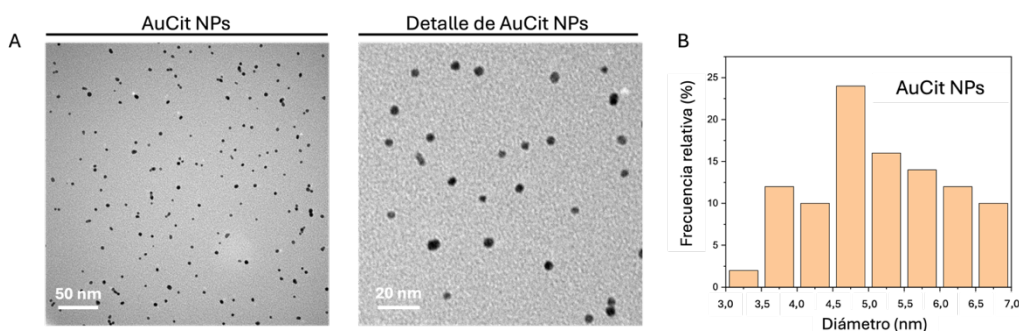


Figura 11. A) Fotografías de TEM de AuCit NPs después del tratamiento con CO y detalle de estas. B) Histograma de distribución de tamaños de las AuCit NPs.

Uno de los picos de absorción en la región del SPR para las AuNPs estabilizadas con PVP se ubicó a 545 nm (**Figura 4.6**). Sin embargo, al estabilizar estas NPs con citrato, el pico se desplazó ligeramente hacia 527 nm como se muestra en la **Figura 12 A**. Este cambio hacia longitudes de onda más cortas, conocido como desplazamiento hacia la región UV del espectro electromagnético, es de nuevo debido al efecto SPR (descrito anteriormente) e indica una reducción en el tamaño de las partículas y una menor polidispersión. Estos datos de caracterización fisicoquímica demuestran como el citrato estabiliza las NPs de manera más efectiva (comparado con el PVP), favoreciendo una síntesis más controlada dando lugar a partículas más pequeñas y uniformes en comparación con el PVP [31].

En el espectro de FTIR de la **Figura 12 B**, se observa como los picos característicos del citrato estaban también presentes en las AuCit NPs. Entre ellos, cabe destacar el grupo hidroxilo (OH) en la región de $3200-3600\text{ cm}^{-1}$ y el grupo carboxilato (COO^-) que se manifiesta en dos picos alrededor de $1550-1610\text{ cm}^{-1}$ y $1300-1420\text{ cm}^{-1}$.

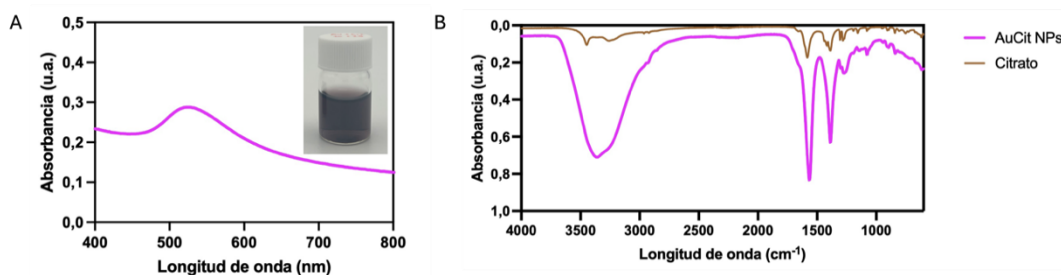


Figura 12. A) Espectro de absorción UV-Vis de las AuCit NPs, mostrando un pico de absorbancia máximo a aproximadamente a 527 nm. B) Espectro FTIR del citrato y de las AuCit NPs.

Al igual que con el citrato, se probó la estabilización con un ligando de características diferentes como la lisina según lo descrito en la bibliografía [32]. Se emplearon varias proporciones molares de lisina respecto al oro (Lys/Au), como se detalla en la **sección 3.1**, y se seleccionó la mayor relación de lisina con el objetivo de una mayor estabilización de las NPs. Sin embargo, el proceso en este estudio difiere del descrito en la literatura debido al uso de CO como agente reductor, en lugar de NaBH_4 , y a la variación en las condiciones de reacción. Al utilizar CO como reductor y realizar la reducción a temperatura ambiente durante 40 minutos (similar a las condiciones para las AuNPs estabilizadas con PVP y citrato), no se logró la reducción deseada, lo que obligó a realizar el proceso a 50°C . Es probable que las diferencias en la estrategia de síntesis, específicamente el uso de CO como agente reductor, hayan influido en los resultados observados.

En la **Figura 13 A** se presentan imágenes obtenidas mediante TEM de las nanopartículas de Au estabilizadas con lisina (AuLys NPs), mostrando detalles estructurales ampliados. Estas imágenes revelaron que las NPs obtenidas usando este estabilizante positivo, presentaban diferentes formas poliédricas, triangulares y esféricas. Además, el diagrama de distribución de tamaños en la **Figura 13 B** muestra que el diámetro promedio de las AuLys NPs es de $6,4 \pm 0,8$ nm, indicando una distribución de tamaños bastante uniforme. Estos resultados son coherentes con los reportados en el estudio de Cai y Yao *et al.*, que también encontraron tamaños en un rango similar [23].

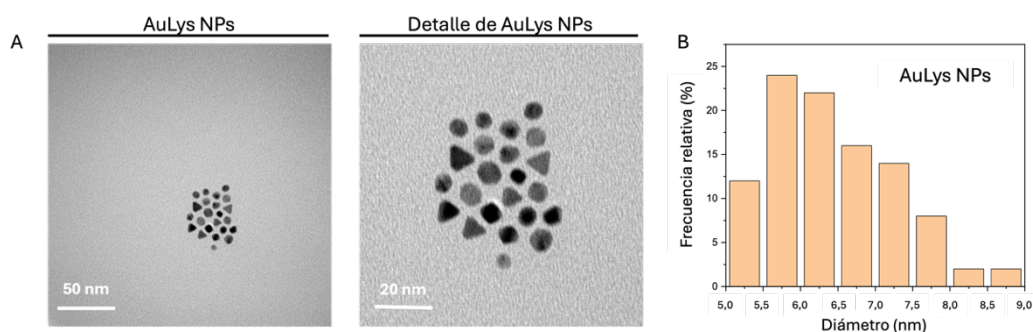


Figura 13. A) Fotografías de TEM de AuLys NPs después del tratamiento con CO y detalle de estas. B) Histograma de distribución de tamaños de las AuLys NPs.

La carga superficial de las AuLys NPs fue de $-6,13 \pm 0,98$ mV. Este valor es notablemente menos negativo en comparación con los potenciales de carga superficial de AuNPs estabilizadas con otros agentes como PVP o citrato, que tienden a ser más negativos (alrededor de -15 mV). La diferencia en la carga superficial se debe a las propiedades de la lisina. Este aminoácido, con su grupo α -amina protonado y sus grupos carboxílicos desprotonados, crea una superficie zwitteriónica y anfílica en las NPs a pH 7,4 [47]. La presencia de estas cargas opuestas en la superficie contribuye a una carga neta menos negativa y a una pequeña fracción de agregados en la disolución. La capacidad de la lisina para interactuar tanto con ambientes acuosos como no acuosos también juega un papel en la estabilidad y el comportamiento de las nanopartículas, como se detalla en el artículo de Selvakannan *et al.* [48].

En la **Figura 14 A** se muestra el espectro de UV-Vis de las AuLys NPs, que presenta un pico máximo de absorbancia en la región del visible, alrededor de 536 nm. Este valor es consistente con el reportado en el estudio de Cai y Yao *et al.*, donde se observó un pico similar [49]. La disminución del pico de SPR de 545 nm (observado para las AuNPs estabilizadas con PVP) a 536 nm para las AuLys NPs está relacionado con la reducción en el tamaño y la mayor homogeneidad de las NPs, similar a los efectos observados con el estabilizante citrato. En la **Figura 14 B** se recoge el espectro de FTIR en el que se muestran picos de algunos de los grupos funcionales más característicos de la lisina. Se observa un pico asociado al grupo hidroxilo (OH) en el rango de 3200 a 3600 cm^{-1} . Además, el espectro muestra la presencia del grupo carboxilato (COO^-), que se manifiesta a través de dos picos en las regiones de 1550 a 1610 cm^{-1} y 1300 a 1420 cm^{-1} .

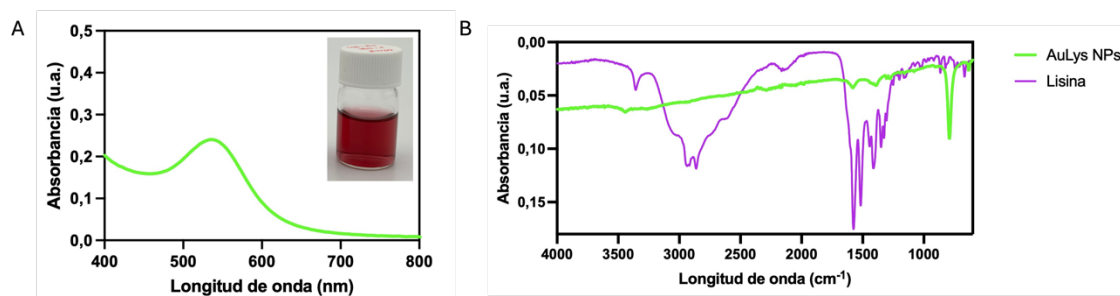


Figura 14. A) Espectro de absorción UV-Vis de las AuLys NPs, mostrando un pico de absorbancia máximo a aproximadamente a 536 nm. B) Espectro FTIR de la lisina, del K_2CO_3 y de las AuLys NPs.

Tanto las imágenes obtenidas mediante TEM como los espectros de UV-Vis muestran que, al reemplazar el PVP con estabilizantes como el citrato y la lisina, las AuNPs obtenidas son significativamente más monodispersas y homogéneas. Estos estabilizantes contribuyen a una reducción en el tamaño de las NPs y a una mayor uniformidad en su distribución de tamaños, en comparación con las NPs estabilizadas con PVP. Dado que los resultados obtenidos con citrato y lisina muestran una mejor calidad en términos de tamaño y distribución, se decidió continuar con los experimentos posteriores utilizando exclusivamente las AuLys NPs y las AuCit NPs.

4.2. Aislamiento y caracterización de exosomas de células de glioblastoma humano

En primer lugar y como control, se caracterizaron los Exos^{U251-MG} en ausencia de partículas. Las imágenes de TEM (**Figura 15 A**) muestran vesículas con tamaño y morfología acordes con la descrita previamente para Exos^{U251-MG} (estructuras redondeadas de entre 30 y 150 nm de diámetro) [50][51][52]. En algunas de las imágenes es posible también apreciar la doble bicapa lipídica característica de estas vesículas (indicada en la **Figura 15.A** con una flecha). El histograma de distribución de tamaños se muestra en la **Figura 15 B** revelando un diámetro medio de $78,6 \pm 14,5$ nm. Este valor es consistente con los rangos reportados en la literatura para exosomas de células similares, confirmando la precisión y validez de las mediciones realizadas [21][28].

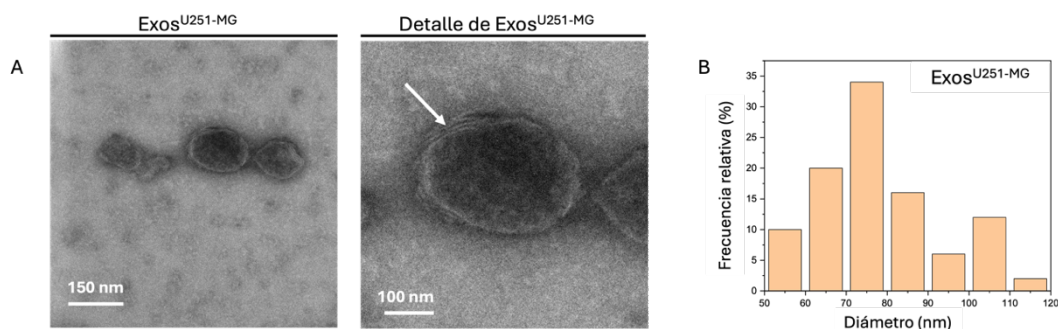


Figura 15. A) Fotografías de TEM de Exos^{U251-MG} sin tratamiento (control). Además, se recoge el detalle de los exosomas. B) Histograma de distribución de tamaños de los Exos^{U251-MG}.

Además, se analizó el diámetro hidrodinámico de los exosomas por NTA, obteniéndose un tamaño de $158,7 \pm 55,9$ nm. En concordancia con la bibliografía, el diámetro hidrodinámico fue superior al obtenido a partir de las fotografías de TEM [21]. Esto es de nuevo debido a que técnicas como 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 carga superficial de los exosomas se evaluó y se obtuvo un valor de $-10,02 \pm 0,96$ mV. Este potencial negativo es característico de los grupos fosfatos en las cabezas polares de la membrana fosfolipídica que rodea a los exosomas. La carga superficial negativa juega un papel crucial en la estabilidad de los exosomas en disolución, ya que las interacciones electrostáticas repulsivas entre las partículas cargadas negativamente ayudan a prevenir su agregación. Aunque el valor medido es relativamente bajo en comparación con otros estudios que han reportado cargas superficiales de hasta -20 mV o -30 mV, sigue siendo representativo para exosomas derivados de células similares [53].

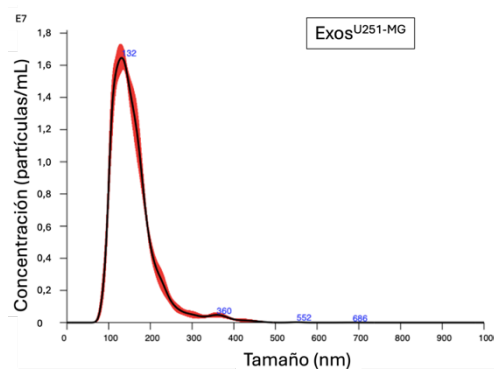


Figura 16. Gráfico de NTA de los Exos^{U251-MG}.

Finalmente, se utilizó el kit MACSPlex EV (Miltenyi Biotec), previamente descrito, para analizar la expresión de proteínas exosomales mediante citometría de flujo (**Figura 17**). Este análisis permitió detectar expresión marcadores exosomales clave, como CD9, CD63 y CD81, en los Exos^{U251-MG}. La presencia de estos marcadores confirma que las vesículas analizadas son efectivamente exosomas y no otro tipo de VEs de naturaleza diferente (por ejemplo cuerpos apoptóticos, microvesículas o ectosomas) [54].

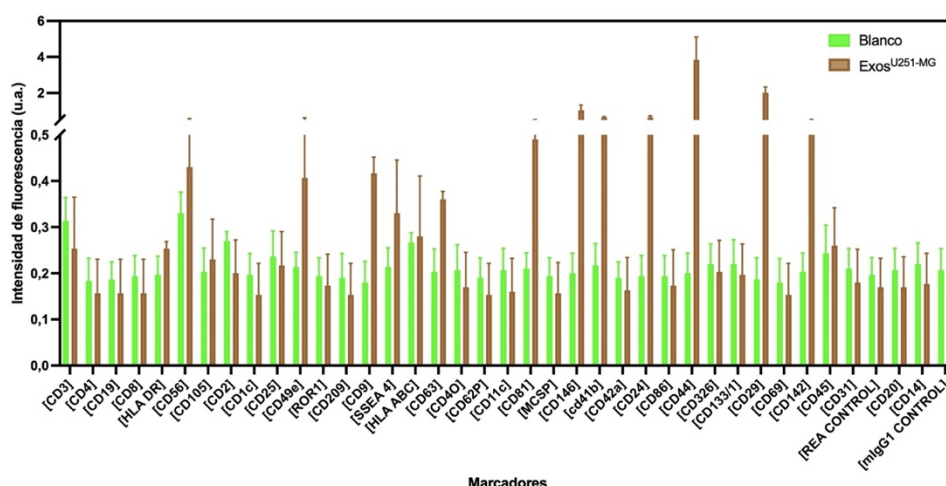


Figura 17. Intensidad de fluorescencia de los diferentes marcadores exosomales medida por citometría de flujo de Exos^{U251-MG} en comparación con las intensidades obtenidas por el blanco.

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

4.3.1. Exosomas derivados de células U251-MG cargados con nanoláminas de Pd

La **figura 18 A** muestra una fotografía representativa de TEM de los exosomas derivados de células U251-MG cargados con PdNSs (Pd-Exos^{U251-MG}). Como se ha descrito anteriormente en la **sección 3.6**, estos exosomas se incuban durante 12h con 0,06 mM K₂PdCl₄ y se al tratamiento de reducción con CO para generar las PdNSs en el interior. En la fotografía se pueden distinguir esas NSs en el interior de los exosomas. Los histogramas de distribución de tamaños de los Pd-Exos^{U251-MG} y de las PdNSs generadas en su interior se recogen en la **Figura 18 B**. El diámetro de los Pd-Exos^{U251-MG} fue de $47,6 \pm 14,5$ nm, comparable al obtenido para los exosomas control derivados de esta misma línea celular (**sección 4.2**). Esto demuestran que ni la aplicación de CO durante 40 minutos ni la presencia final de las nanoestructuras de Pd afectaron significativamente al tamaño de los exosomas ni a su morfología redondeada. Por su parte, las PdNSs generadas en el interior de las vesículas exhibían un tamaño de $5,1 \pm 1,7$ nm, significativamente menor comparado al de las PdNSs sin encapsular. Esta disminución en el tamaño de las NSs puede atribuirse tanto a la presencia del exosomas, que actúan como un entorno confinado limitando el crecimiento de las NSs, como a posibles influencias del entorno bioquímico dentro del núcleo del exosoma, que podría afectar la formación y el tamaño de las nanoestructuras.

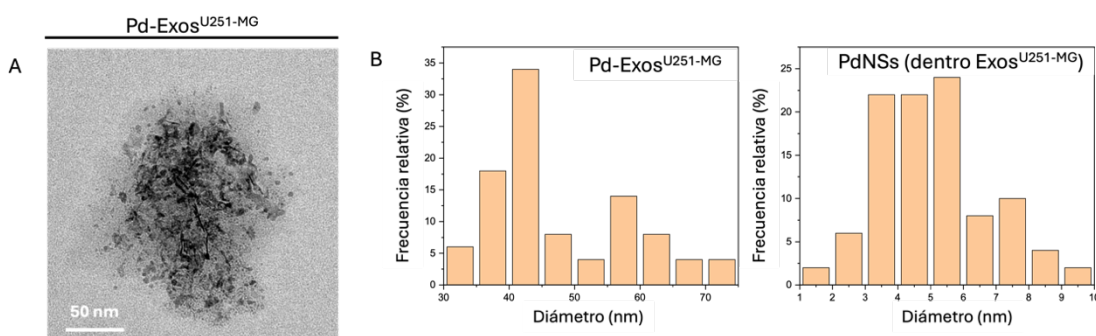


Figura 18 A) Fotografía TEM de Pd-Exos^{U251-MG} en la que se pueden apreciar las PdNSs en el interior del exosoma. **B)** Histogramas de distribución de tamaños de los Pd-Exos^{U251-MG} y de las PdNSs formadas en su interior.

De manera similar, analizando el diámetro hidrodinámico de los Pd-Exos^{U251-MG} no se observaron alteraciones significativas respecto a los Exos^{U251-MG}, (**Figura 19 A y Figura 16**). Los Pd-Exos^{U251-MG} presentaron un diámetro de $176,4 \pm 89,8$ nm, en comparación con el diámetro medio obtenido para los Exos^{U251-MG} que aparece en la **sección 4.2**. La carga superficial de los exosomas no se vio afectada por el tratamiento de CO en presencia del precursor de Pd. Se obtuvieron valores de $-10,17 \pm 1,89$ mV similares a los obtenidos para los Exos^{U251-MG} ($-10,02 \pm 0,96$ mV).

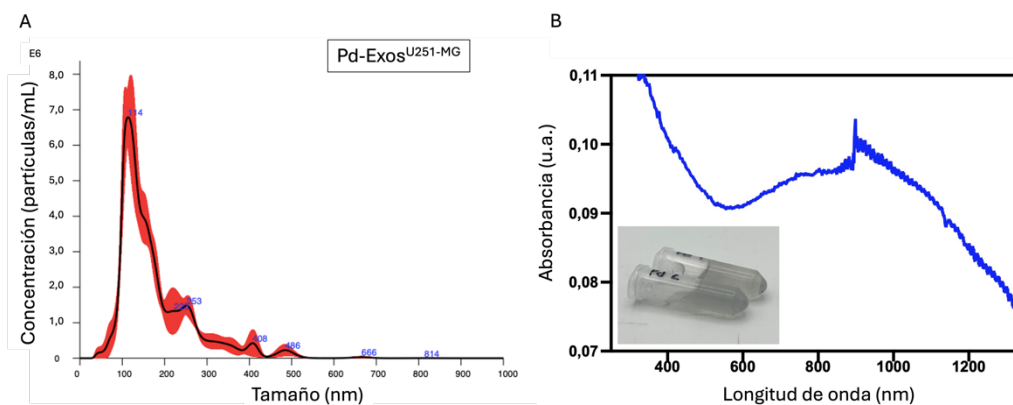
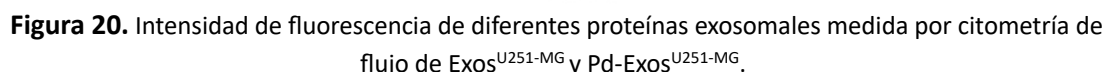


Figura 19. A) Gráfico de NTA de Pd-Exos^{U251-MG}. B) Espectro de absorción UV-Vis de los Pd-Exos^{U251-MG}, mostrando un pico de absorbancia máxima a aproximadamente a 899 nm.

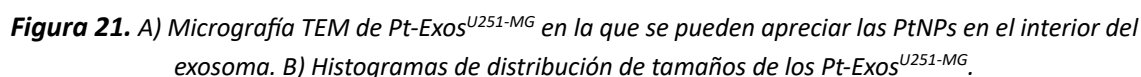
La cantidad de Pd en el interior de los exosomas se cuantificó mediante MP-AES y se expresó en relación con la masa de los exosomas (expresada en términos de proteína total obtenida por BCA), obteniéndose un valor de $0,38 \mu\text{g}$ de Pd por μg de exosoma. Como se menciona en los anexos, las muestras se digirieron con agua regia y la masa de Pd determinada se relacionó con la cantidad total de proteína de los exosomas, calculada mediante el ensayo de BCA.

Dado que las PdNSs presentan efecto SPR, se analizó el patrón de absorbancia de los Pd-Exos^{U251-MG} en la región del UV-Vis. El espectro reveló un pico máximo de absorbancia en la región del NIR, concretamente alrededor de 899 nm (**Figura 19 B**) similar al obtenido para las PdNSs sin encapsular mostrado anteriormente (**Figura 6**). Este máximo de absorción es característico de estas estructuras de Pd en forma de nanolamina hexagonal y con un espesor de 1,5 nm [28].

Finalmente, para evaluar si la expresión de las proteínas presentes en la membrana de los exosomas se veía alterada durante la reacción con CO y la generación de las PdNSs, los Exos^{U251-MG} y los Pd-Exos^{U251-MG} se analizaron por citometría de flujo usando el kit MACS Plex mencionado anteriormente. En la **Figura 20**, se puede observar que el contenido proteico y la expresión de las diferentes proteínas es similar antes y después de la carga de Pd, lo que sugiere que ni la aplicación de la atmósfera de CO a alta presión ni la generación de las PdNSs *in situ* en el interior de estos afectan a la expresión de dichas proteínas características como se reporta en literatura.



El procedimiento descrito en la sección anterior se aplicó también para la síntesis de PtNPs en el interior de los exosomas a partir de H_2PtCl_6 como agente precursor. Como se ha descrito en la **sección de materiales y métodos**, el precursor de platino 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. La **Figura 21** muestra los exosomas derivados de células U251-MG cargados con PtNPs (Pt-Exos^{U251-MG}), al igual que en el caso de los Pd-Exos^{U251-MG}, los exosomas mantenían intacta su estructura redondeada de aproximadamente 100 nm de diámetro. Sin embargo, en este caso no fue posible apreciar directamente las partículas de Pt en su interior, debido a su pequeño tamaño. El diámetro calculado para los Pt-Exos^{U251-MG} fue de $78,3 \pm 14,8$ nm. Por su parte, el tamaño microscópico de las PtNPs era tan pequeño que no pudo calcularse con precisión, lo que justifica la necesidad de emplear técnicas de microscopía electrónica de alta resolución para su visualización. La cuantificación de Pt mediante MP-AES, seguida de su normalización en función de la concentración de exosomas (determinada a través de la cantidad de proteína total usando el ensayo de BCA), indicó un valor de 1.37 μg de Pt por μg de proteína total.



El análisis por NTA reveló que tanto el diámetro como la concentración de exosomas no se vieron afectados por el tratamiento con CO en presencia del precursor de Pt y la posterior generación de las PtNPs (**Figura 22**). Los Pt-Exos^{U251-MG} presentaron un diámetro de $132,8 \pm 50,9$ nm, en comparación con el obtenido para los Exos^{U251-MG} que fue de $158,7 \pm 55,9$ nm (**sección 4.2**). La carga superficial de estos exosomas fue similar a la de los exosomas control, se obtuvieron valores de $-8,19 \pm 2,22$ mV manteniendo su característica carga negativa de sus membranas fosfolipídicas como se reporta en bibliografía [55].

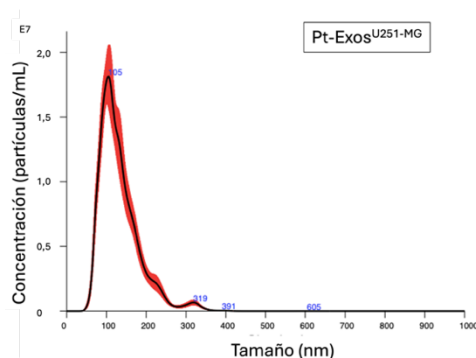


Figura 22. Gráfico de NTA de Pt-Exos^{U251-MG}.

Al igual que con los Pd-Exos^{U251-MG}, también verifiqué la expresión de las proteínas exosomales, comparando los exosomas vacíos (Exos^{U251-MG}) con los Pt-Exos^{U251-MG} (**Figura 23**). Tal como se esperaba, se confirmó de nuevo que la presencia de estas partículas no alteraba significativamente a la expresión de algunos marcadores exosomales como por ejemplo CD9, CD63 ni CD81, ni por tanto, la naturaleza de los exosomas. Por tanto, tanto los Exos^{U251-MG} como los Pt-Exos^{U251-MG} expresaban positivamente las proteínas exosomales analizadas.

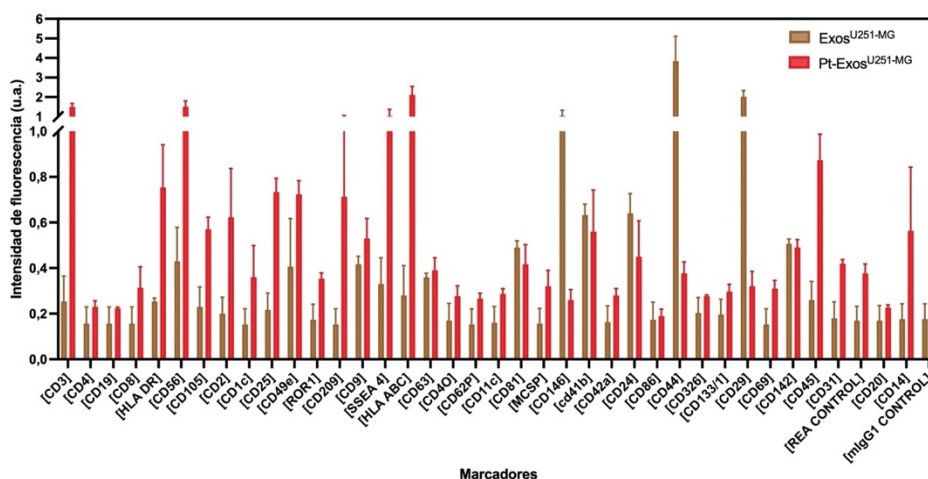


Figura 23. Intensidad de fluorescencia medida por citometría de flujo de Exos^{U251-MG} y Pt-Exos^{U251-MG}.

4.3.3. Exosomas derivados de células U251-MG cargados con nanopartículas de Au

Como se ha descrito anteriormente, en este trabajo se han sintetizado NPs de Pd y Pt en el interior de exosomas, siguiendo un procedimiento pionero desarrollado y publicado por el grupo de investigación donde se ha realizado el estudio [27][55]. Sin embargo, lo novedoso de esta investigación radica en la implementación exitosa de este mismo proceso para la síntesis de AuNPs dentro de los exosomas, algo que no se ha reportado hasta la fecha. Este avance representa un paso significativo, ya que abre nuevas posibilidades en el uso de exosomas como

vehículos para AuNPs, ampliando el potencial de estas vesículas en aplicaciones emergentes en diversos campos científicos.

Siguiendo la misma metodología basada en el uso de CO como agente reductor, pero cambiando el tipo de precursor metálico (HAuCl_4), se ha llevado a cabo la síntesis de las AuNPs en el interior de $\text{Exos}^{\text{U251-MG}}$ ($\text{Au-Exos}^{\text{U251-MG}}$).

En la **Figura 24 A**, se pueden observar imágenes de TEM de los $\text{Au-Exos}^{\text{U251-MG}}$, las cuales confirman la presencia de vesículas orgánicas de morfología redondeada de $57,7 \pm 9,5$ nm de diámetro comparables con los exosomas control descritos anteriormente. Además, se distinguen claramente esferas más oscuras en su interior, con un tamaño promedio de $7,8 \pm 1,5$ nm, correspondientes a las AuNPs. Estos valores se han calculado a partir de la distribución de tamaños mostrada en la **Figura 24 B**, obtenida a partir de las imágenes TEM. El análisis cuantitativo de la cantidad de Au mediante MP-AES y su normalización por la cantidad de exosomas (expresado en proteína total obtenida por el ensayo de BCA) reveló una cantidad de 0,67 μg de Au por μg de proteína total.

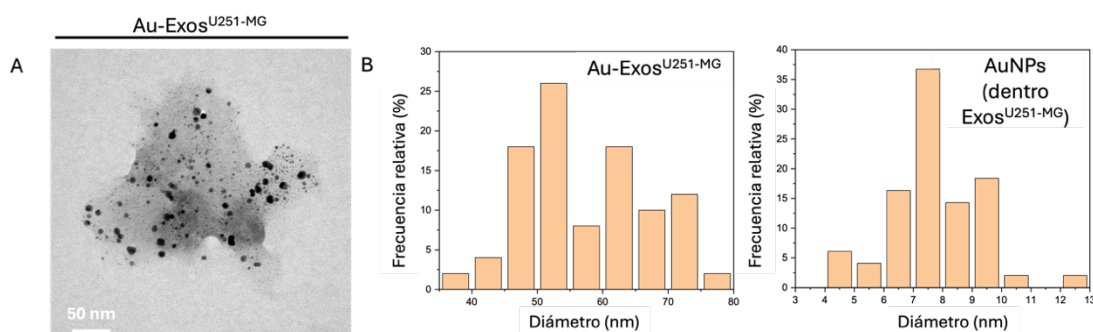


Figura 24. A) Fotografía TEM de $\text{Au-Exos}^{\text{U251-MG}}$ en la que se pueden apreciar las AuNPs en el interior del exosoma. B) Histogramas de distribución de tamaños de los $\text{Au-Exos}^{\text{U251-MG}}$ y de las AuNPs formadas en su interior.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de NTA indicaron que la presencia de las AuNPs dentro de los exosomas no alteró de manera significativa el tamaño de estas vesículas. Como se puede observar en la **Figura 25 A**, el diámetro promedio de los $\text{Au-Exos}^{\text{U251-MG}}$ fue de $168,5 \pm 76,0$ nm, mientras que los $\text{Exos}^{\text{U251-MG}}$ presentaron un diámetro promedio de $158,7 \pm 55,9$ nm (**sección 4.2**). Estos resultados sugieren que la encapsulación de las AuNPs en los exosomas no tiene un impacto considerable en su tamaño hidrodinámico, como ocurrió con los $\text{Pd-Exos}^{\text{U251-MG}}$ y con los $\text{Pt-Exos}^{\text{U251-MG}}$.

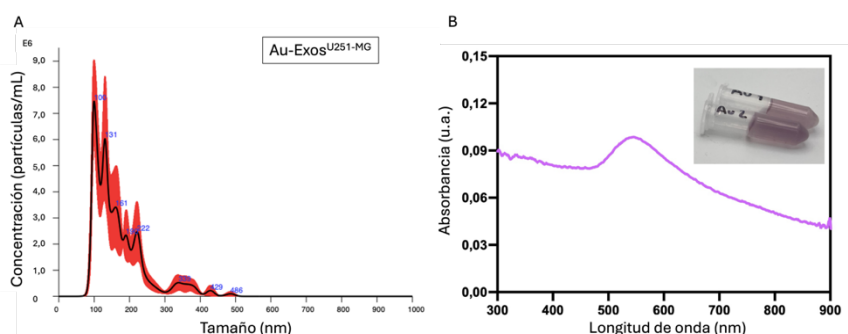


Figura 25. A) Gráfico de NTA de $\text{Au-Exos}^{\text{U251-MG}}$. B) Espectro de absorción UV-Vis de los $\text{Au-Exos}^{\text{U251-MG}}$, mostrando un pico de plasmón absorbancia máxima a aproximadamente a 545 nm.

Dado que las AuNPs exhiben efecto SPR, los Au-Exos^{U251-MG} fueron analizados mediante espectroscopía de absorbanza en el UV-Vis. Como se observa en la **Figura 25 B**, se identificó un pico máximo de absorción a 545 nm, característico de AuNPs con una morfología esférica y un diámetro inferior a 10 nm [56]. Asimismo, al medir la carga superficial de los Au-Exos^{U251-MG}, se obtuvo un valor negativo de $-15,01 \pm 1,38$ mV, similar a los valores registrados para los Exos^{U251-MG}, Pd-Exos^{U251-MG} y Pt-Exos^{U251-MG}.

Finalmente se realizó un análisis de citometría de flujo con el kit MACS Plex para examinar la expresión proteica en los exosomas. Se compararon los Exos^{U251-MG} con aquellos cargados con AuNPs (**Figura 26**). Los resultados mostraron que la mayoría de los marcadores proteicos clave se mantuvieron prácticamente sin cambios tras la carga de las AuNPs (entre ellos proteínas exosomales fundamentales como CD9, CD81 o CD63), lo que sugiere que el proceso no afectó de manera significativa ni la integridad de la membrana ni la naturaleza de los exosomas. Sólo algunos marcadores como CD146, CD24, CD86 o CD29 se vieron afectados por la presencia de las NPs dentro de los exosomas. Este análisis sigue la misma línea de investigación que los realizados previamente con exosomas cargados con PdNs y PtNPs. En todos los casos, los resultados fueron consistentes, mostrando una preservación similar de la expresión proteica. Esto sugiere que la incorporación de NPs, independientemente del material utilizado, no altera significativamente los marcadores proteicos clave en la membrana de los exosomas.

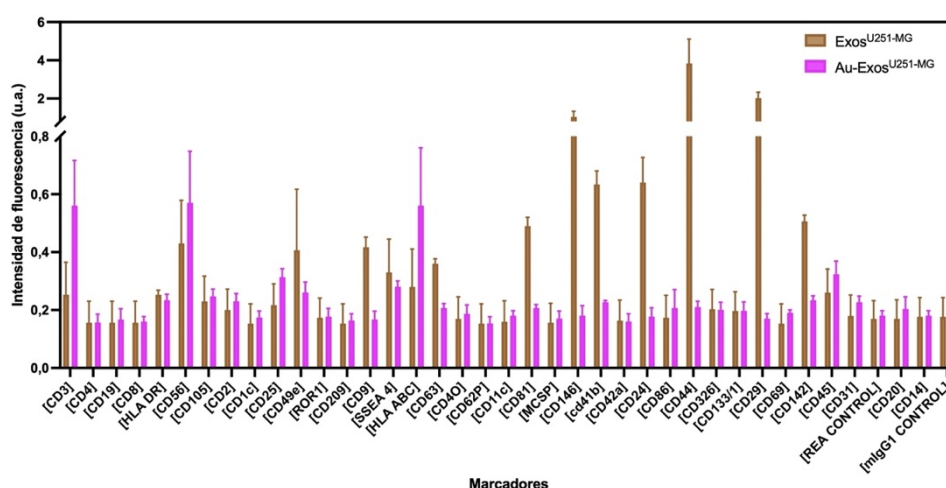


Figura 26. Intensidad de fluorescencia medida por citometría de flujo de exosomas control y Au-Exos^{U251-MG}.

En resumen, los resultados mostrados en esta sección demuestran que la presencia de los diferentes tipos de nanoestructuras metálicas generadas *in situ* en el interior de los exosomas, preservó la integridad, morfología, estructura y funcionalidad de los exosomas tratados. La **Figura 27** muestra un resumen comparativo de las características de los exosomas cargados con los diferentes tipos de NPs. Se trata de una metodología altamente reproducible, rápida y fácilmente adaptable en función del objetivo de la síntesis (versatilidad), caracterizada 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 y la concentración de precursor, 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 terapéuticas en el campo de la

biomedicina. Esta estrategia de encapsulación de NPs terapéuticas en exosomas supone una novedosa alternativa a los métodos fisicoquímicos de encapsulación forzada de NPs (sonicación, choque térmico, incubación a temperatura ambiente en ausencia y presencia de saponina y electroporación) publicados hasta la fecha [27][57], los cuales dan lugar a eficacias de encapsulación relativamente bajas, y por lo general, causan un daño muy significativo a la membrana exosomal y por lo tanto a su uso y funcionalidad como vectores selectivos de NPs terapéuticas.

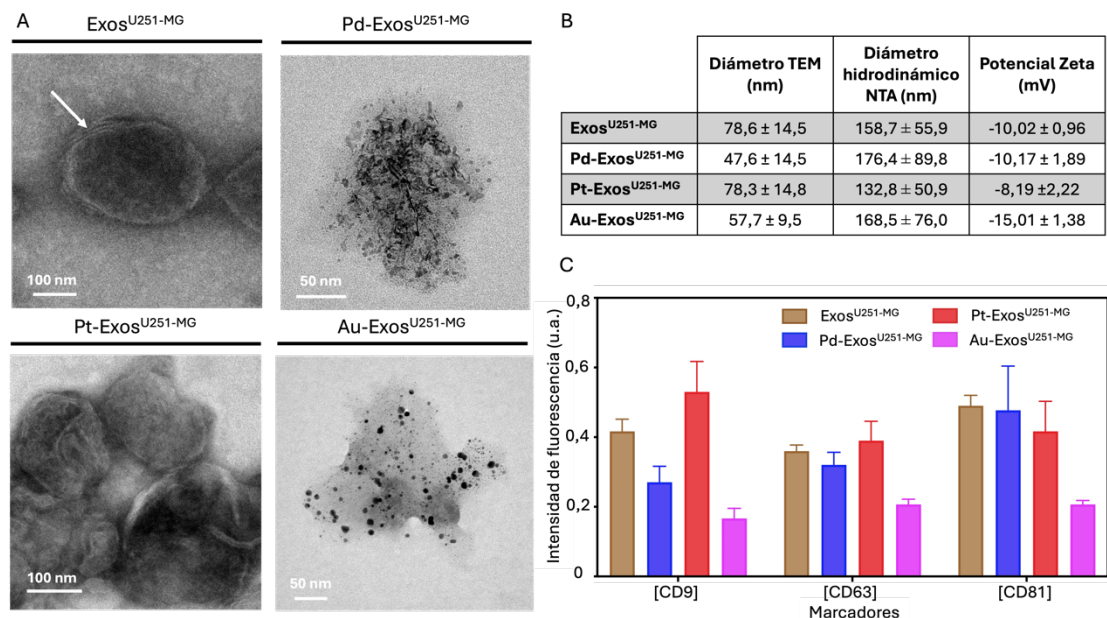


Figura 27. Resumen comparativo de las características de los exosomas cargados con los diferentes tipos de NPs en el que se muestran A) micrografías TEM de cada tipo de exosoma, B) tabla resumen de los diferentes diámetros obtenidos (TEM y NTA) y los potenciales Zeta correspondientes, C) gráfica comparativa de los principales marcadores exosomales (CD9, CD63 y CD81).

4.4. Estudio de la corona de proteínas

Los productos derivados de la nanotecnología están siendo ampliamente estudiados en el campo médico por las interesantes propiedades físicas y químicas que ofrecen, convirtiéndolos en una novedosa alternativa a la medicina convencional para el tratamiento y diagnóstico de una gran variedad de enfermedades. Cuando estas NPs entran en contacto con un fluido biológico, proteínas y otras biomoléculas se unen a su superficie formando la conocida como CP que cambia por completo la identidad biológica y las propiedades terapéuticas de las NPs (p.ej son reconocidas y fagocitadas por el sistema inmunitario, cambian su estabilidad y estado de agregación, etc). Por ello, la caracterización de dicha CP es clave para poder predecir el destino y el comportamiento de las NPs terapéuticas diseñadas hoy en día y facilitar así su traslación al ámbito clínico. En este trabajo se ha evaluado como la encapsulación de los nanomateriales en el interior de exosomas previene y modifica completamente las características de la CP, lo que determina drásticamente su acumulación en las células diana tumorales y potencia el uso de exosomas como agentes direccionables para la entrega selectiva de nanoterapias hacia tumores (campo emergente en los últimos diez años).

4.4.1. Estudio de la corona de proteínas de las nanopartículas

Para estudiar la evolución de la CP a lo largo del tiempo, se diseñó una estrategia experimental en la que las muestras de NPs se pusieron en contacto con medio de cultivo DMEM (con FBS al 10 %) durante distintos tiempos, tal y como se explica en la **sección 3.8.1**. Las muestras se dejaron en contacto durante intervalos de tiempo establecidos: 5 minutos (como tiempo de incubación corto) , 4 y 24 horas (como tiempos de incubación largos), permitiendo que las proteínas del medio se adsorbieran gradualmente en la superficie de los diferentes vectores, formando la *soft corona* y *hard corona*, respectivamente. Posteriormente, se utilizó la electroforesis para analizar las proteínas adsorbidas en la superficie de las NPs permitiendo la caracterización de la CP formada alrededor de estas NPs. Además, se aplicaron técnicas complementarias como el análisis por NTA y la medición del potencial zeta para obtener una visión integral de su estabilidad y estado de agregación (factores también clave en la formación de la CP que determinan el destino final de las NPs). Este enfoque multidimensional permitió una comprensión completa de cómo la CP evoluciona en función del tiempo de incubación y las condiciones experimentales, proporcionando datos sobre la composición, el tamaño y la estabilidad de las NPs en un entorno biológico.

En la **Figura 28 A** se muestra el gel de electroforesis de las PdNSs con la CP formada a los diferentes tiempos de incubación observándose la evolución de las bandas de proteínas en función del tiempo en los diferentes carriles. Además, dado que el azul de Coomassie se une estequiométricamente a las proteínas presentes en el gel, este marcador nos permitió semicuantificar la intensidad (y por lo tanto la cantidad) de proteínas adsorbidas alrededor de las NPs. En la **Figura 28 B** se muestra el estudio estadístico en el que se representa la intensidad de píxel frente al tiempo transcurrido cuantificado a partir de los geles de electroforesis. Se puede observar como a mayor intensidad del píxel, hay un mayor número de proteínas formando la CP. Se pueden observar diferencias significativas entre todos los tiempos para las PdNSs. Las diferencias en los patrones de bandas sugieren una variabilidad en la concentración de las CP formadas con el tiempo.

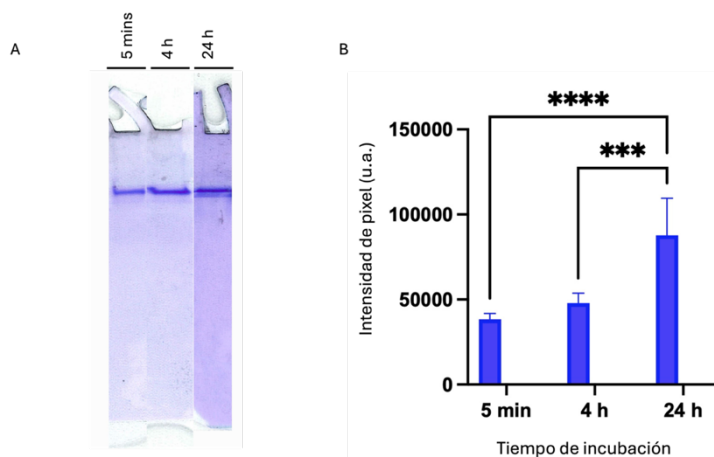


Figura 28. A) Gel de electroforesis de PdNSs en contacto con DMEM a diferentes tiempos. B) Diagrama estadístico de la intensidad de los píxeles de las bandas de electroforesis de las PdNSs a diferentes tiempos.

Además, del gel SDS-PAGE para estudiar la CP formada, se evaluó la estabilidad y agregación de las diferentes NPs presentes en un medio biológico. Los resultados de NTA revelaron que el tamaño de las PdNSs se veía afectado con el paso del tiempo (**Figura 29**) como

resultado de la formación de la CP. En concreto este estudio evidenció diámetros hidrodinámicos de $147,0 \pm 66,8$ nm, $157,9 \pm 64,5$ nm y $156,2 \pm 66,6$ nm, a los 5 min, 4 h y 24 h, respectivamente. Este aumento en el diámetro hidrodinámico confirma la formación de una CP en la superficie de estas partículas conforme aumenta el tiempo de incubación con el fluido biológico (en este caso, medio de cultivo).

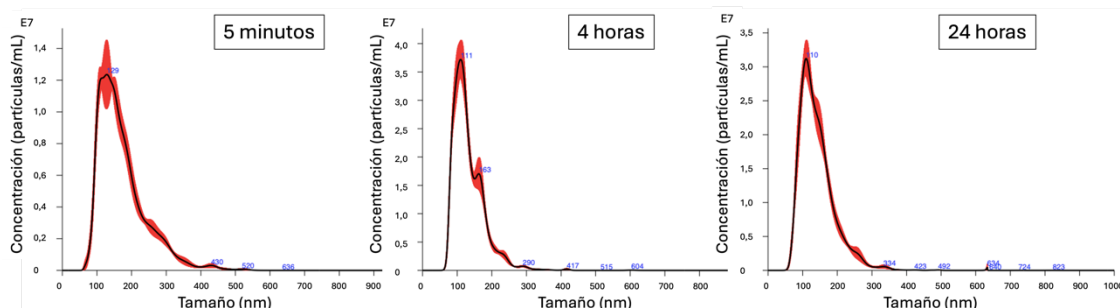


Figura 29. Gráficos de NTA de PdNSs en el estudio de la CP a diferentes tiempos.

También se estudió la variación de la carga superficial de las PdNSs con el tiempo. Se obtuvieron valores de $-9,74 \pm 1,26$ mV a los 5 minutos, $-4,22 \pm 1,16$ mV a las 4 horas y $-0,874 \pm 0,60$ mV a las 24 horas. Estos valores mostraron como la carga de la superficie de las NPs presentaba una tendencia a neutralizarse, pasando de valores negativos a aproximarse a 0. Este fenómeno se debe posiblemente a que las PdNSs, inicialmente cargadas negativamente, atraen la adsorción en su superficie formando la CP de proteínas cargadas positivamente del medio, lo que resulta en la neutralización progresiva de la carga superficial de las partículas dando lugar a su agregación y disminución de la estabilidad en el medio. Esta neutralización de la carga y disminución de la estabilidad va en consecuencia con el aumento de diámetro hidrodinámico mostrado en la **Figura 29** y con la formación de la CP alrededor del nanomaterial objeto de estudio.

Al igual que para las PdNSs sin encapsular, en la **Figura 30 A** se muestra el gel de electroforesis de las PtNPs en el que se pueden ver la evolución de las bandas de proteínas en función del tiempo y la **Figura 30 B** recoge el estudio estadístico de semicuantificación de la intensidad de píxel frente al tiempo transcurrido. Como ocurría con las PdNSs, se pueden apreciar diferencias significativas entre todos los tiempos. Sin embargo, estos resultados muestran un comportamiento diferente. Puede apreciarse como en el caso de las PtNPs la cantidad de proteínas adsorbidas a su superficie formando la CP fue mucho mayor pasados 5 minutos respecto a los tiempos de incubación largos de 4 y 24 h, al contrario de lo que ocurría con las PdNSs. Como se ha descrito en la introducción, la CP puede dividirse en *hard corona* y *soft corona* (en función de los tiempos de intercambio de moléculas). Tiempos largos para la *hard corona* y cortos para la *soft corona*. En la *soft corona* se adsorben las proteínas más abundantes con mayor movilidad en el fluido biológico, pero con el tiempo estas proteínas acaban siendo desplazadas y reemplazadas por aquellas con más afinidad para formar la *hard corona*. Por lo tanto, estos resultados indican que en el caso de las PtNPs, la formación de esta *soft corona* es mucho más abundante que la de la *hard corona*.

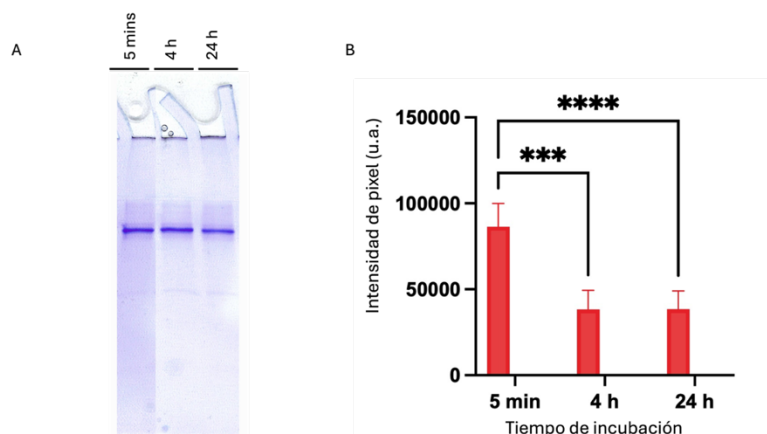


Figura 30. A) Gel de electroforesis de PtNPs en contacto con DMEM a diferentes tiempos. B) Diagrama estadístico de la intensidad de los pixeles de las bandas de electroforesis de las PtNPs a diferentes tiempos.

Los resultados obtenidos mediante NTA revelaron que el tamaño de las PtNPs se veía también influenciado por el paso del tiempo, lo que se atribuye a la formación de la CP (**Figura 31**). Las mediciones del diámetro hidrodinámico a 5 minutos y 24 horas fueron de $242,6 \pm 99,9$ nm y $236,7 \pm 106,5$ nm, respectivamente, confirmando que el tamaño de las PtNPs cambia con el tiempo. A las 4 horas no se obtuvieron datos fiables sobre el diámetro. Estos resultados sugieren que la formación de la CP puede saturar la superficie de las PtNPs a tiempos cortos, provocando una disminución gradual en el tamaño hidrodinámico con el tiempo, en línea con lo observado en el estudio de electroforesis. Además, se evaluó la variación de la carga superficial de las PtNPs a lo largo del tiempo, encontrando valores de $-8,37 \pm 0,33$ mV a los 5 minutos, $-7,81 \pm 0,64$ mV a las 4 horas y $-7,87 \pm 0,53$ mV a las 24 horas.

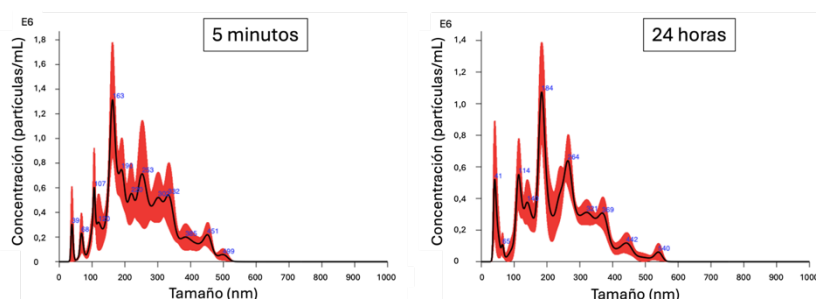


Figura 31. Gráficos de NTA de PtNPs en el estudio de la CP a diferentes tiempos.

Para completar el estudio de la formación de la CP en las diferentes NPs sin encapsular sintetizadas con Au, se utilizaron los dos tipos de AuNPs sintetizadas anteriormente: AuLys NPs y AuCit NPs. Los resultados se presentan en la **Figura 32 A**, donde se muestran los geles de electroforesis que evidencian las bandas de proteínas asociadas a cada tipo de partícula. La **Figura 32 B** ilustra estos cambios con datos estadísticos que respaldan las observaciones visuales de los geles. Para las AuLys NPs, se detectaron diferencias significativas en la cantidad de proteínas asociadas de la CP en todos los tiempos de incubación. Esto sugiere que, a medida que pasa el tiempo aumenta la cantidad de proteínas adsorbidas, reflejando un proceso dinámico y gradual en la formación de la CP. En contraste, para las AuCit NPs, no se observaron diferencias significativas en la concentración de la CP con respecto al tiempo de incubación. Esto sugiere que la formación de la corona proteica alrededor de las AuCit NPs ocurre de manera más inmediata y no cambia a lo largo del tiempo. En tiempos cortos, la superficie de estas NPs parece

saturarse rápidamente con proteínas, formándose una *hard corona* que cuya concentración es estable y no cambia significativamente con el tiempo. Este comportamiento implica que la superficie de las AuCit NPs tiene una afinidad particular que permite la formación de una capa de proteínas de alta afinidad rápidamente, sin necesidad de una acumulación gradual.

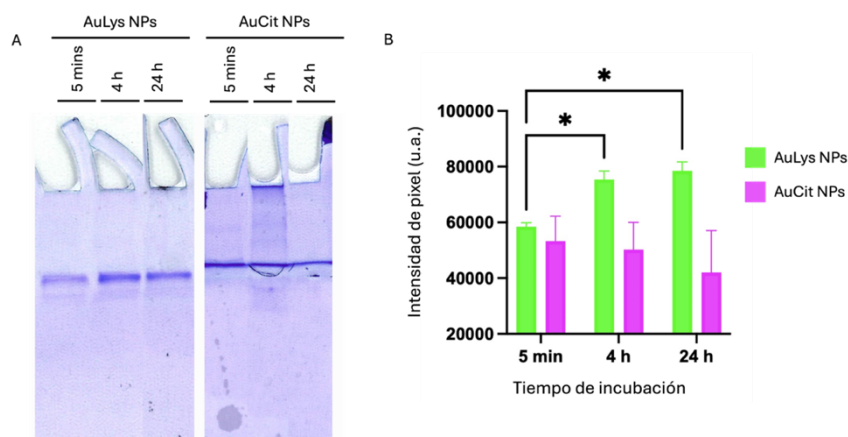


Figura 32. A) Gel de electroforesis de AuLys NPs y AuCit NPs en contacto con DMEM a diferentes tiempos. B) Diagrama estadístico de la intensidad de los pixeles de las bandas de electroforesis de las AuLys NPs y AuCit NPs a diferentes tiempos.

El estudio de la evolución de la CP alrededor de las AuNPs mediante electroforesis se complementó con los resultados de análisis de tamaño por NTA y medición de la carga superficial a lo largo del tiempo, proporcionando una visión más completa de los cambios que experimentan las NPs en función del tiempo de incubación en medio biológico. Para las AuLys NPs, los diámetros registrados a los 5 minutos, 4 horas y 24 horas fueron $185,9 \pm 97,6$ nm, $144,3 \pm 78,0$ nm y $204,9 \pm 97,1$ nm, respectivamente (**Figura 33 A**). Este comportamiento muestra una variación significativa en el tamaño a tiempos cortos, lo que sugiere la formación de una *soft corona*, constituida por una gran cantidad de proteínas con baja afinidad, a los 5 minutos. Sin embargo, conforme el tiempo de incubación aumenta, estas proteínas de baja afinidad son reemplazadas progresivamente por proteínas con mayor afinidad, formando la *hard corona*, lo que se refleja en la disminución del tamaño hidrodinámico a las 4 horas. El ligero aumento en el tamaño a las 24 horas puede deberse a la estabilización de la CP conforme se reorganizan las proteínas de alta afinidad en concordancia con la literatura [23]. Por otro lado, las AuCit NPs mostraron un comportamiento opuesto en cuanto al tamaño hidrodinámico, con diámetros de $136,2 \pm 62,3$ nm a los 5 minutos, $156,4 \pm 73,4$ nm a las 4 horas y $169,4 \pm 95,8$ nm a las 24 horas (**Figura 33 B**). A diferencia de las AuLys NPs, estas mostraron un aumento en el tamaño hidrodinámico con el tiempo, lo que sugiere una adhesión gradual y continua de proteínas a su superficie. Este comportamiento sugiere que las AuCit NPs forman una CP de manera más estable y directa, probablemente a través de la formación inmediata de una *hard corona*, que sigue acumulando proteínas con el tiempo debido a su afinidad por la superficie.

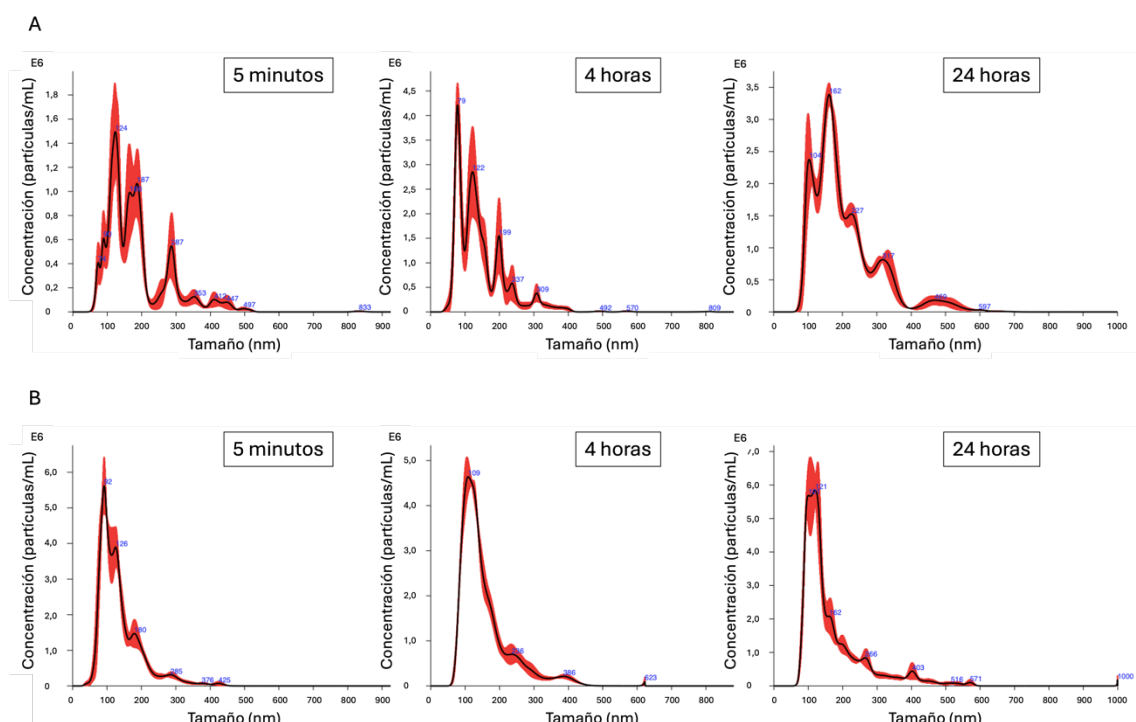


Figura 33. Gráficos de NTA de A) AuLys NPs y B) AuCit NPs en el estudio de la CP a diferentes tiempos.

Además, el análisis de la variación de la carga superficial proporciona más información sobre cómo las AuNPs interactúan con las proteínas del medio. Para las AuLys NPs, la carga superficial inicialmente fue de $-7,59 \pm 1,55$ mV a los 5 minutos, pero con el tiempo esta carga se fue negativizando hasta alcanzar $-19,40 \pm 1,28$ mV a las 24 horas. Este cambio en la carga superficial se atribuye a que las AuLys NPs, inicialmente cargadas menos negativamente, atraen proteínas negativas del medio, lo que resulta en la progresiva negativización de su superficie. Este fenómeno es consistente con la formación de CP y su estabilización a través de la interacción con proteínas cargadas negativamente. En el caso de las AuCit NPs, que comenzaron con una carga superficial más negativa de $-22,38 \pm 1,53$ mV a los 5 minutos, se observó una tendencia a positivizarse con el tiempo, alcanzando $-12,33 \pm 1,78$ mV a las 24 horas. Este cambio hacia valores menos negativos se debe a la atracción de proteínas cargadas positivamente desde el medio, lo que reduce progresivamente la negatividad de la superficie de las partículas, aunque no lo suficiente como para neutralizar completamente la carga.

En resumen, tanto los resultados de NTA como los de la carga superficial están en concordancia con los hallazgos obtenidos a través de la electroforesis. Las AuLys NPs experimentan una formación dinámica de la CP, con una transición clara de una *soft corona* a una *hard corona*, mientras que las AuCit NPs parecen formar una corona proteica más estable desde el principio, con un aumento progresivo en el tamaño y una disminución gradual en la carga negativa superficial. Este análisis multidimensional confirma que las propiedades de la superficie de las NPs, como su carga y afinidad por proteínas específicas, juegan un papel crucial en la formación y estabilidad de la corona proteica.

La **tabla 3** resume los datos de tamaño hidrodinámico y de potencial zeta obtenidos para todos los tipos de NPs y su PC formada a los diferentes tiempos de estudio (5 minutos, 4 horas y 24 horas).

Tabla 3. Tabla resumen que muestra el tamaño hidrodinámico obtenido por NTA y el potencial zeta obtenidos para todos los tipos de NPs y su PC formada a los diferentes tiempos de estudio.

	Diámetro NTA (nm)			Potencial zeta (mV)		
	5 min	4 h	24 h	5 min	4 h	24 h
PdNSs	147,0 ± 66,8	157,9 ± 64,5	156,2 ± 66,6	-9,74 ± 1,26	-4,22 ± 1,16	-0,874 ± 0,60
PtNPs	242,6 ± 99,9	-	236,7 ± 106,5	-8,37 ± 0,33	-7,81 ± 0,64	-7,87 ± 0,53
AuLys NPs	185,9 ± 97,6	144,3 ± 78,0	204,9 ± 97,1	-7,59 ± 1,55	-7,67 ± 1,18	-19,40 ± 1,28
AuCit NPs	136,2 ± 62,3	156,4 ± 73,4	169,4 ± 95,8	-22,38 ± 1,53	-14,42 ± 0,60	-12,33 ± 1,78

4.4.2. Estudio de la corona de proteínas de los exosomas

Como se ha mencionado en la introducción de este trabajo, los exosomas han emergido como vehículos prometedores para la administración de NPs debido a su capacidad inherente de evadir el sistema inmunitario y mejorar la biodistribución de los fármacos o agentes terapéuticos que transportan [57][58]. En concreto, se ha observado que los exosomas presentan un fuerte tropismo hacia las células de las que proceden, lo que ha impulsado numerosos estudios sobre su uso como vectores terapéuticos para transportar moléculas terapéuticas y fármacos a células diana [59]. Una de las características más notables de los exosomas es su capacidad de atravesar barreras biológicas complejas, como la membrana plasmática y la barrera hematoencefálica, lo que permite transportar terapias de manera selectiva a células situadas en áreas de difícil acceso, como el sistema nervioso central, el cerebro o poder llegar a la matriz interna del tumor. Esta propiedad convierte a los exosomas en vehículos ideales para la administración de moléculas terapéuticas y diagnósticas. Estudios *in vitro* desarrollados por el grupo NFP donde se ha realizado este TFM han mostrado como el uso de exosomas como vectores de NPs, ha permitido acumular hasta un 80 % de nanomateriales terapéuticos en las células tumorales, mejorando significativamente la eficacia observada para NPs funcionalizadas con polietilenglicol (PEG) (y acumuladas por efecto pasivo EPR). Se ha demostrado como el uso de exosomas como Caballos de Troya 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. Sin embargo, a pesar de estos prometedores datos, los resultados obtenidos con modelos animales *in vivo* han demostrado una disminución en el porcentaje de terapias acumuladas en los tumores comparado con los modelos celulares *in vitro* más sencillos [60][61]. Si bien, se logró mejorar significativamente la cantidad de NPs acumuladas en los tumores cuando estas estaban encapsuladas en exosomas comparado con NPs sin encapsular (de un 0,4 en forma libre a un 3 % encapsulada en exosomas), estos resultados quedan lejos de los datos obtenidos en modelos celulares *in vitro*. La hipótesis planteada en este trabajo se fundamenta en que esta reducción en la eficacia de entrega cuando se pasa de modelos celulares *in vitro* a modelos animales *in vivo* podría deberse a la formación de la CP alrededor de los exosomas cargados con NPs cuando estos son introducidos en el organismo. Esta CP puede alterar tanto la estabilidad como la biodistribución de los exosomas, lo que podría contribuir a disminuir su efectividad terapéutica.

Al igual que ocurre con las NPs sin encapsular, el entorno biológico influye significativamente en la formación y evolución de la CP de los exosomas. La CP, formada por la adsorción de proteínas presentes en los fluidos biológicos, puede modificar las propiedades físicas y funcionales de los exosomas, afectando su capacidad para entregar eficazmente las NPs a las células objetivo. Por ello, estudiar cómo se desarrolla la CP alrededor de los exosomas a lo largo del tiempo es crucial para comprender y optimizar su función como vectores de NPs.

Un desafío significativo en el estudio de los exosomas como vehículos para la administración de NPs es la caracterización de la CP que se forma alrededor de estos exosomas en el entorno biológico. Los estudios reportados hasta la fecha sobre la existencia y la composición de la CP en exosomas son limitados y aún están en desarrollo. La dificultad principal radica en que, al igual que las NPs artificiales, los exosomas presentan una capa proteica natural, lo que complica el estudio y la discriminación entre las proteínas que forman parte de la CP y las que son componentes intrínsecos de los exosomas [62][63]. Este problema se ve exacerbado por la heterogeneidad de los exosomas, lo que dificulta la identificación de cuáles proteínas son adsorbidas durante la formación de la CP y cuáles son partes de la estructura nativa de los exosomas [64]. Además, la interacción de los exosomas con diversas biomoléculas en el entorno biológico puede alterar tanto la estabilidad como la biodistribución de las NPs que transportan, afectando potencialmente su eficacia terapéutica [65]. Por todo ello, es crucial avanzar en la comprensión de cómo se desarrolla la CP alrededor de los exosomas y cómo esta afecta su función como Caballos de Troya para transportar nanomedicinas, un área que requiere más investigación para resolver las inconsistencias y mejorar la precisión en la optimización de estas estrategias de administración [66][67][68][69].

En este estudio, se ha analizado la evolución temporal de la CP en exosomas vacíos y cargados con las diferentes NPs descritas en las secciones anteriores. Para ello, los exosomas (tanto vacíos como cargados) se incubaron en DMEM durante diferentes periodos de tiempo (4 y 24 horas) para permitir la formación de la CP, tal y como se explica en la **sección 3.8.2** al igual que para las NPs sin encapsular. Los resultados obtenidos se compararon con los exosomas control que no estuvieron en contacto con el medio. A diferencia de los estudios realizados con NPs sin encapsular, no se incluyó un tiempo de incubación corto de 5 minutos, debido a las limitaciones técnicas del proceso de precipitación de los exosomas, que requiere centrifugación a alta velocidad (100000 g) durante 2 horas para recuperar los exosomas. En el estudio de la evolución de la CP alrededor de los exosomas se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE complementada por análisis de su tamaño hidrodinámico por NTA.

La **Figura 34 A** muestra un gel de electroforesis de los Exos^{U251-MG} en el que se puede ver la evolución de las bandas de proteínas en función del tiempo, en concordancia con el estudio estadístico mostrado en la **Figura 34 B**. Las diferencias en los patrones de bandas sugieren una variabilidad en la concentración y cantidad de las CP formadas con el tiempo que estaría de acuerdo con la formación de una *soft* corona constituida por una gran cantidad de proteínas con baja afinidad, que conforme el tiempo de incubación se extiende, son reemplazadas progresivamente por proteínas con mayor afinidad, formando la *hard corona* [23]. Sin embargo, cuando los exosomas se incubaron con medio de cultivo para generar la CP, en estos geles se están observando todas las proteínas (incluyendo aquellas relativas a las proteínas asociadas a la CP y también al propio exosoma), por lo que no es sencillo poder diferenciar ambos componentes.

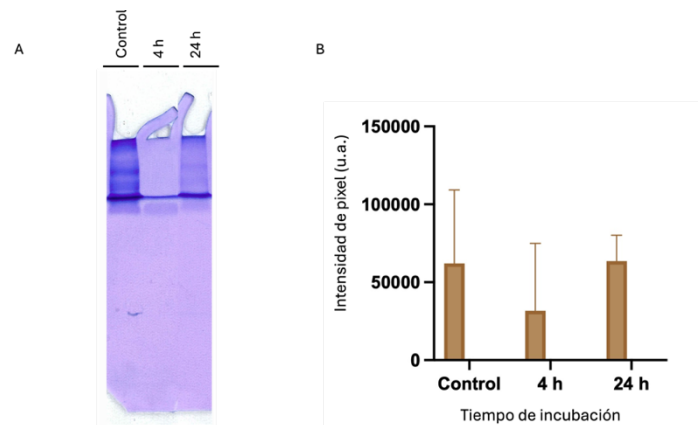


Figura 34. A) Gel de electroforesis de Exos^{U251-MG} en contacto con DMEM a diferentes tiempos. B) Diagrama estadístico de la intensidad de los pixeles de las bandas de electroforesis de los Exos^{U251-MG} a diferentes tiempos.

Los resultados de NTA revelaron que el tamaño de los exosomas se veía afectado con el paso del tiempo (**Figura 35**) como resultado de la formación de la CP. Presentaron unos diámetros diferentes a tiempo 0 (control), a las 4 horas y a las 24 horas. Los valores fueron de $158,7 \pm 55,9$ nm, $216,8 \pm 95,8$ nm y $201,4 \pm 74,4$ nm, respectivamente. Indican un aumento en el diámetro hidrodinámico tras la incubación en DMEM, lo que confirma la formación de una capa proteica en la superficie de estas partículas.

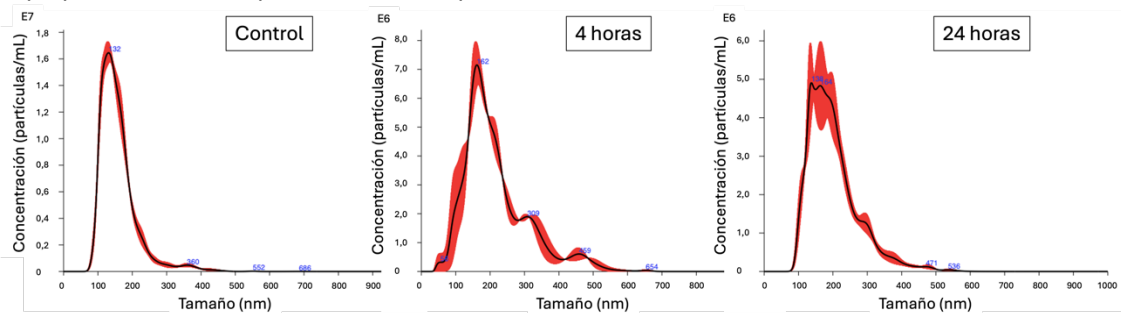


Figura 35. Gráficos de NTA de Exos^{U251-MG} en el estudio de la CP a diferentes tiempos.

El análisis mediante electroforesis SDS-PAGE y NTA se hizo con todos los tipos de Exos^{U251-MG} cargados con las diferentes nanopartículas. La **Figura 36 A** muestra un gel de electroforesis de los Pd-Exos^{U251-MG} en el que se pueden ver el aumento significativo de proteínas en función del tiempo. El estudio estadístico respalda el gel mostrando ese aumento de proteínas (**Figura 36**).

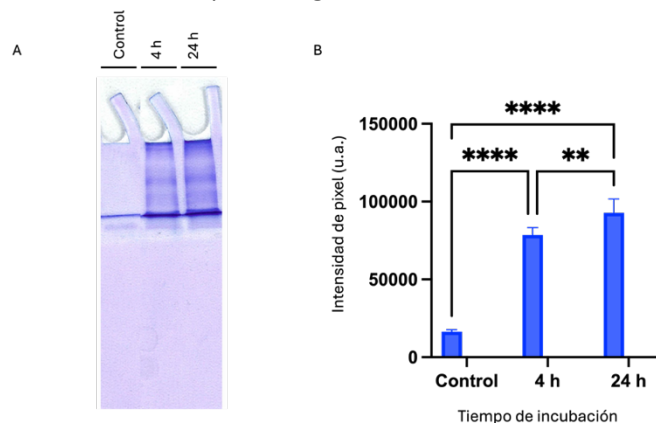


Figura 36. A) Gel de electroforesis de Pd-Exos^{U251-MG} en contacto con DMEM a diferentes tiempos. B) Diagrama estadístico de la intensidad de los pixeles de las bandas de electroforesis de las Pd-Exos^{U251-MG} a diferentes tiempos.

Los resultados de NTA mostraron concordancia con la electroforesis y el estudio estadístico (**Figura 37**). Los Pd-Exos^{U251-MG} presentaron un aumento de los diámetros conforme el tiempo de incubación, pasando de valores de $163,5 \pm 70,1$ nm en Pd-Exos^{U251-MG} control a $236,7 \pm 89,9$ nm a las 4 horas y $257,3 \pm 98,6$ nm a las 24 horas. Para complementar esta información, se ha estudiado la variación de la carga superficial de estos exosomas con el tiempo y la formación de la CP. Los Pd-Exos^{U251-MG} comenzaron con una carga superficial negativa de $-10,17 \pm 1,89$ mV que tendió a positivizarse con el tiempo, alcanzando $-1,43 \pm 1,29$ mV a las 24 horas, demostrando la adherencia a su membrana de proteínas. El aumento en la cantidad de proteínas localizadas en los Pd-Exos^{U251-MG} así como la neutralización de su carga superficial y el correspondiente aumento de su tamaño hidrodinámico y agregación podría atribuirse a la forma hexagonal de estas PdNSs que podrían quedar expuestas en la superficie del exosomas en lugar de completamente encapsuladas, modificando su superficie y por tanto aumentando la CP formada a su alrededor.

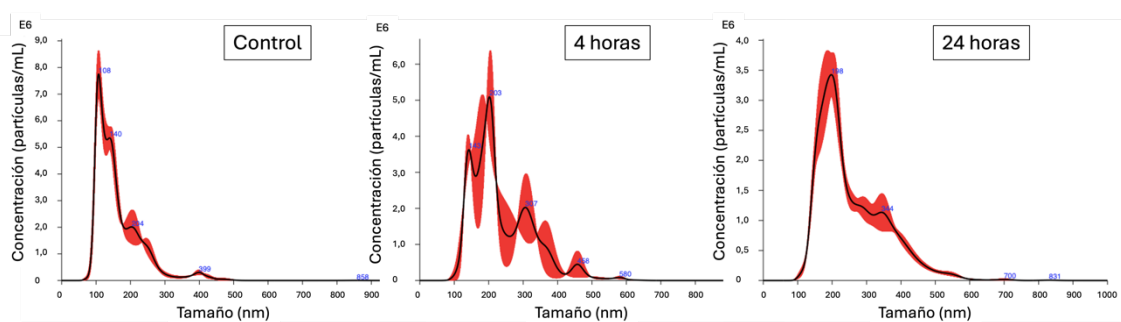


Figura 37. Gráficos de NTA de Pd-Exos^{U251-MG} en el estudio de la CP a diferentes tiempos.

Los Pt-Exos^{U251-MG}, mostraron un comportamiento diferente al de los exosomas de Pd. Tanto en el gel SDS-PAGE (**Figura 38 A**) como en el estudio estadístico (**Figura 38 B**) se muestra como la CP es máxima a las 4 horas, lo que podría suponer una saturación de la CP.

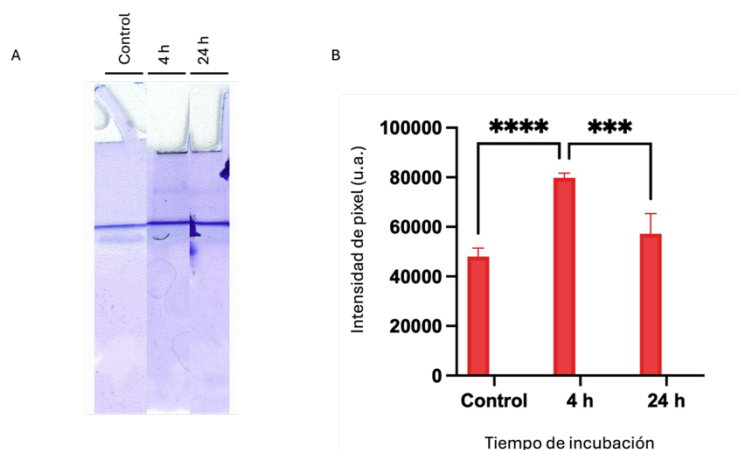


Figura 38. A) Gel de electroforesis de Pt-Exos^{U251-MG} en contacto con DMEM a diferentes tiempos. B) Diagrama estadístico de la intensidad de los pixeles de las bandas de electroforesis de las Pt-Exos^{U251-MG} a diferentes tiempos.

El NTA respaldó estos resultados mostrando un diámetro hidrodinámico de estos exosomas control de $112,9 \pm 65,9$ nm, que aumentó hasta $208,2 \pm 77,3$ nm a las 4 horas para acabar disminuyendo a $164,9 \pm 69,9$ nm transcurridas 24 horas (**Figura 39**). Este comportamiento anómalo se observa también en la variación de la carga superficial, en los Pt-Exos^{U251-MG} control presentan valores negativos de $-8,19 \pm 2,22$ mV que disminuyen a las 4 horas

hasta alcanzar valores próximos a cero ($-1,98 \pm 0,88$ mV) para después aumentar hasta alcanzar los $-11,69 \pm 1,53$ mV. Estos datos podrían estar relacionados con el tamaño extremadamente pequeño de las PtNPs, que pueden quedar adheridas a la bicapa fosfolipídica de los exosomas en lugar de ser internalizadas completamente.

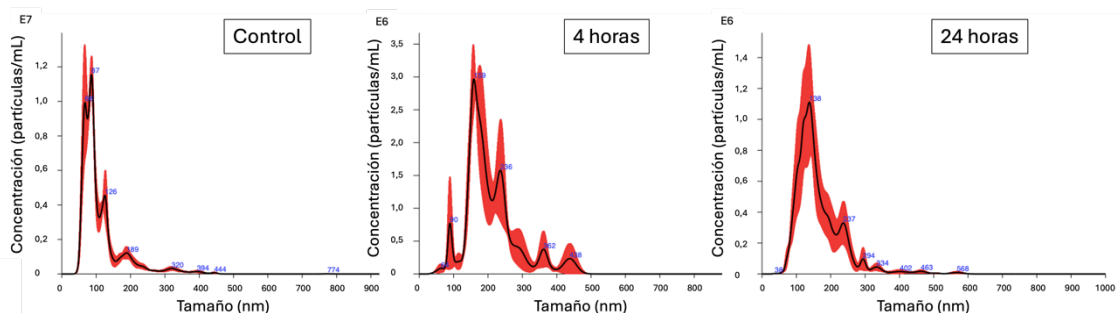


Figura 39. Gráficos de NTA de Pt-Exos^{U251-MG} en el estudio de la CP a diferentes tiempos.

Por último, los Au-Exos^{U251-MG} mostraron un comportamiento similar a los exosomas control vacíos (Exos^{U251-MG}), en los que se puede observar la formación temprana de una *soft corona*, que conforme transcurre el tiempo de incubación reemplazada progresivamente sus proteínas por otras de mayor afinidad, formando la *hard corona* [23], como se muestra en la Figura 40 .

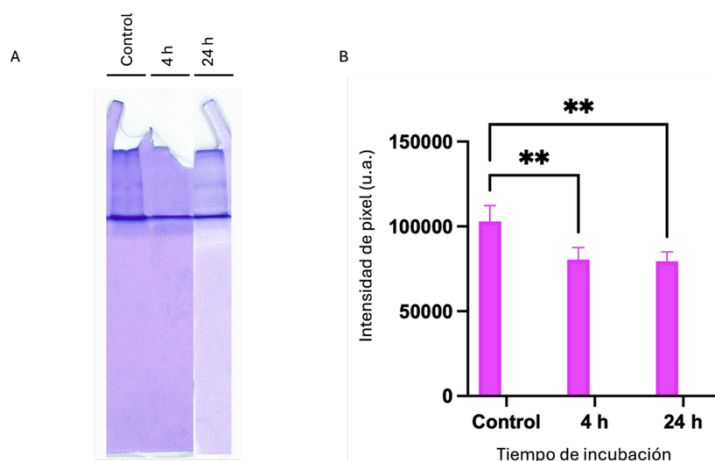


Figura 40. A) Gel de electroforesis de Au-Exos^{U251-MG} en contacto con DMEM a diferentes tiempos. B) Diagrama estadístico de la intensidad de los pixeles de las bandas de electroforesis de Au-Exos^{U251-MG} a diferentes tiempos.

Los Au-Exos^{U251-MG} presentaron unos diámetros diferentes a tiempo 0, a las 4 horas y a las 24 horas, obteniendo valores de $144,3 \pm 72,9$ nm, $232,7 \pm 91,1$ nm y $222,1 \pm 90,1$ nm, respectivamente (**Figura 41**). Este aumento del tamaño hidrodinámico estaría en concordancia con la formación de la CP y con la variación de la carga superficial de estos exosomas obtenida. En la que la carga de los Au-Exos^{U251-MG} control inicialmente es de $-15,01 \pm 1,38$ mV hasta alcanzar los $-4,30 \pm 0,53$ mV como ocurría con los Pd-Exos^{U251-MG}, que tendían a neutralizarse.

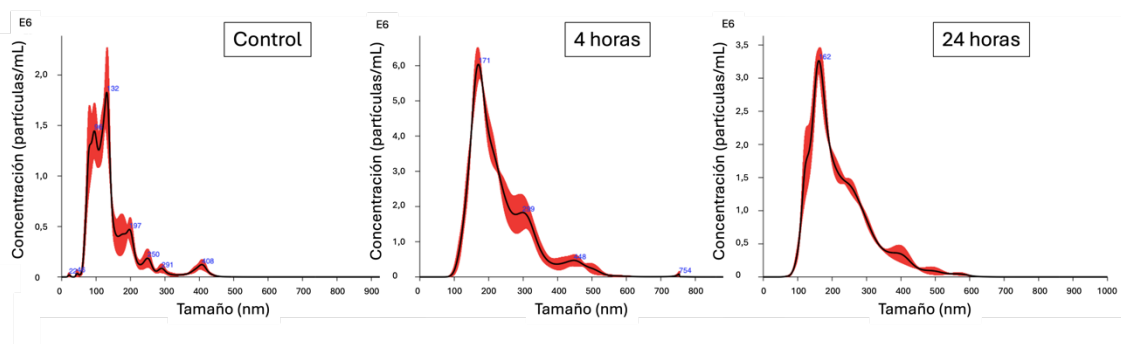


Figura 41. Gráficos de NTA de Au-Exos^{U251-MG} en el estudio de la CP a diferentes tiempos.

La **tabla 4** resume los datos de tamaño hidrodinámico y de potencial zeta obtenidos para los Exos^{U251-MG} y los NPs-Exos^{U251-MG} (Pd-Exos^{U251-MG}, Pt-Exos^{U251-MG} y Au-Exos^{U251-MG}) incubados con medio de cultivo y la correspondiente PC formada alrededor de los mismos a los diferentes tiempos de estudio (4 y 24 h).

Tabla 4. Tabla resumen que muestra el tamaño hidrodinámico obtenido por NTA y el potencial zeta obtenidos para todos los tipos de Exos^{U251-MG} y su PC formada a los diferentes tiempos de estudio.

	Diámetro NTA (nm)			Potencial Zeta (mV)	
	Control	4 h	24 h	Control	24 h
Exos ^{U251-MG}	158,7 ± 55,9	216,8 ± 95,8	201,4 ± 74,4	-10,02 ± 0,96	-
Pd-Exos ^{U251-MG}	163,5 ± 70,1	236,7 ± 89,9	257,3 ± 98,6	-10,17 ± 1,89	-1,43 ± 1,29
Pt-Exos ^{U251-MG}	112,9 ± 65,9	208,2 ± 77,3	164,9 ± 69,9	-8,19 ± 2,22	-11,69 ± 1,53
Au-Exos ^{U251-MG}	144,3 ± 72,9	232,7 ± 91,1	222,1 ± 90,1	-15,01 ± 1,38	-4,30 ± 0,53

4.4.3. Estudio proteómico

Una vez estudiada fisicoquímicamente la CP formada alrededor de los diferentes materiales, y en colaboración con el investigador Dr. Joaquín Sanz del BIFI, se llevó a cabo un análisis bioinformático para poder identificar las proteínas presentes en los geles SDS-PAGE tras ser procesadas por espectroscopia de masas como se ha descrito en la parte experimental de este trabajo usando un espectrómetro de masas de alta resolución y movilidad iónica TIMS TOF FLEX. El estudio se realizó con PdNSs, PtNPs y AuNPs (como ejemplos de nanomateriales desnudos) incubados durante 5 minutos, 4 y 24 horas, y con Pd-Exos^{U251-MG}, Pt-Exos^{U251-MG} y Au-Exos^{U251-MG} (nanomateriales encapsulados en exosomas) y los Exos^{U251-MG} como exosomas control vacíos incubados durante 4 y 24 horas.

Una vez identificadas las diferentes proteínas presentes en cada muestra, el paso sucesivo fue realizar un control de calidad de los datos obtenidos, cuyo objetivo era asegurar la reproducibilidad de los experimentos e identificar posibles *outliers* que no siguieran el patrón observado. En la **Figura 42 A**, se presenta el control de calidad de las proteínas detectadas en los exosomas. Los resultados muestran una detección promedio de entre 250 y 500 proteínas por muestra, con una distribución uniforme en la mayoría de las réplicas. Sin embargo, una réplica del grupo Pd-Exos^{U251-MG} a las 4 horas presentó un comportamiento distinto, pero no pudo ser clasificada como un *outlier*, lo que sugiere que los datos eran consistentes. La **Figura 42 B** muestra el control de calidad de las proteínas detectadas en las NPs sin encapsular. A pesar de

mostrar una distribución uniforme, el número promedio de proteínas detectadas fue menor que en los exosomas, situándose entre 150 y 300 proteínas. Esta diferencia en el número de proteínas se atribuye a que los exosomas expresan ya intrínsecamente proteínas, detectándose por tanto todas aquellas proteínas asociadas a la formación de la CP y también aquellas intrínsecas al exosoma.

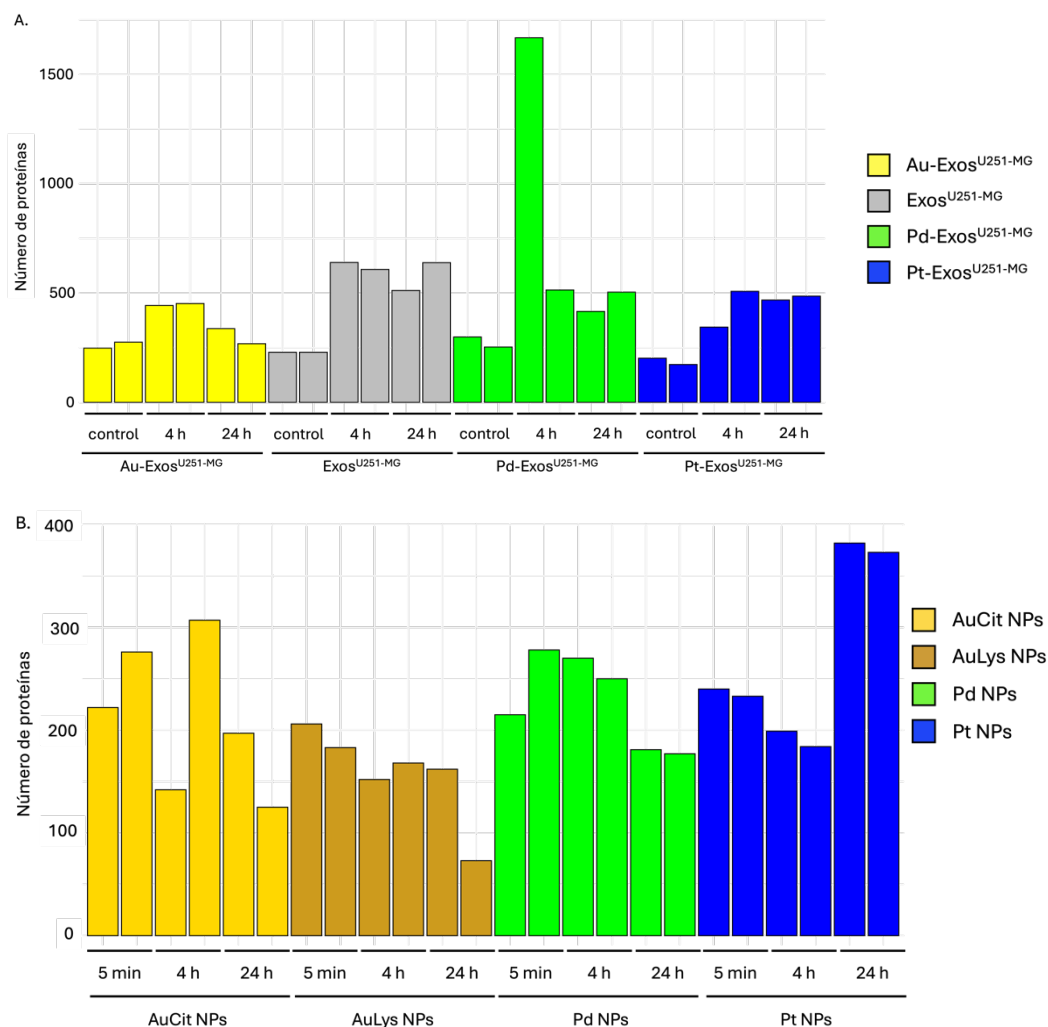


Figura 42. Gráficas que representan el control de calidad realizado en el que se muestran el número de proteínas detectadas frente al tiempo y A) al tipo de Exo^{U251-MG} o B) al tipo de NPs.

Posteriormente se realizó un PCA, que es un método de estudio de características no supervisado ampliamente usado para procesar conjuntos de datos y reducir su dimensionalidad con pérdida mínima de información. En el **anexo 2**, la **Figura A.10** muestra el análisis de los componentes principales de todas las muestras juntas. Los símbolos huecos corresponden a muestras de Exos^{U251-MG} y los sólidos a NPs sin encapsular. El color indica el material de la partícula: los tonos amarillos hacen referencia a las AuNPs, el verde a las PdNPs, el azul a las de PtNPs y las de color gris corresponden con los Exos^{U251-MG} vacíos. En los gráficos, los tiempos de incubación se representan mediante diferentes formas geométricas. El círculo indica las muestras incubadas durante 5 minutos, el cuadrado señala las muestras incubadas durante 4 horas, y el triángulo denota las muestras incubadas durante 24 horas.

Los resultados revelan la formación de tres clústeres distintos en el análisis. El primer clúster agrupa los exosomas a los 5 minutos de incubación, los cuales, tras 4 y 24 horas, se reagrupan en un segundo clúster. Se observa un salto significativo en la formación de la CP de los exosomas entre los 5 minutos y los tiempos más prolongados, un fenómeno que no se presenta con las NPs sin encapsular. En el caso de las NPs, la dinámica de formación de la corona es más gradual, sin diferencias notables entre los tiempos cortos y largos. Este comportamiento diferencial indica que, efectivamente, la CP se forma más rápidamente en las NPs sin encapsular al ser introducidas en el medio biológico. En el caso de los exosomas, la formación de la CP es significativamente menor a los 5 minutos en comparación con los tiempos de 4 y 24 horas, lo que sugiere una formación más lenta de la CP. Este fenómeno puede deberse a que los exosomas, al ser VEs biológicas producidas por las propias células, no son reconocidos inmediatamente como partículas extrañas y por lo tanto su CP se desarrolla de manera más lenta y gradual.

Esta observación es relevante para la justificación del uso de exosomas como vehículos de administración de NPs. La menor formación de CP en tiempos cortos en los exosomas podría contribuir a una mayor estabilidad y eficacia de las terapias dirigidas, ya que los exosomas pueden evadir el reconocimiento y la respuesta inmunitaria inicial más eficientemente que las NPs sin encapsular, maximizando así su acumulación en los tejidos cancerosos diana [1][57].

Para comprender mejor la influencia del tipo de partícula y el tiempo en cada clúster, se analizaron por separado las muestras correspondientes a cada uno de los tres clústeres y se examinaron los componentes principales para identificar los patrones presentes en los datos.

En la **Figura A.11** se presenta el análisis PCAs del primer clúster, que incluye únicamente los exosomas a los 5 minutos de incubación, tanto vacíos como cargados con las diferentes NPs. Este análisis revela que los Pt-Exos^{U251-MG} a los 5 minutos muestran una similitud notable con los Exos^{U251-MG} vacíos, en comparación con los Au-Exos^{U251-MG} y Pd-Exos^{U251-MG}, que se distinguen claramente entre sí y de los Exos^{U251-MG}. Las mayores distancias en los gráficos sugieren que hay un mayor número de proteínas diferencialmente expresadas entre los grupos, indicando efectos más pronunciados en la composición proteica.

La **Figura A.12** muestra el PCAs del segundo clúster, que incluye los exosomas incubados durante 4 horas y 24 horas, es decir, en tiempos prolongados de formación de la CP. Este análisis revela que, a estos tiempos largos, los Pt-Exos^{U251-MG} tienen un perfil proteico mucho más diferente comparado con los Exos^{U251-MG}. Por otro lado, los Au-Exos^{U251-MG} muestran un patrón de cambio en la formación de la corona más tardío, con diferencias notables a partir de las 4 horas de incubación. A las 4 horas, los Exos^{U251-MG} vacíos no presentan una separación significativa de los Pd-Exos^{U251-MG} ni con los Au-Exos^{U251-MG}. Esto sugiere que las diferencias en la composición de la CP se vuelven más evidentes en los Pd-Exos^{U251-MG} y los Au-Exos^{U251-MG} solo después de 4 horas de incubación.

Según los análisis presentados en las **Figuras A.11 y A.12**, se observa que a las 24 horas de incubación, los Au-Exos^{U251-MG} y Pd-Exos^{U251-MG} se asemejan más a los Exos^{U251-MG} vacíos en comparación con los Pt-Exos^{U251-MG}. Estos datos indican que la presencia de PtNPs en el interior de los exosomas podrían estar alterando sus propiedades y funcionalidad, modificando su comportamiento en los fluidos biológicos. Esta alteración no es deseable, ya que el objetivo del uso de Caballos de Troya es utilizar elementos como los exosomas para cargarlos como NPs

terapéuticas y conservar al mismo tiempo sus propiedades de direccionamiento selectivo hacia células tumorales sirviendo como transportadores activos.

Finalmente, la **Figura A.13** presenta el PACs del tercer clúster, que incluye todas las NPs sin encapsular. El patrón observado indica que clusterizan principalmente por tipo de partícula, lo que refleja diferencias significativas en la composición de la CP según el tipo de nanopartícula.

En el contexto de nuestro estudio sobre la evolución de la CP en NPs y en exosomas, se ha empleado un análisis DE de proteínas para identificar y cuantificar las diferencias en los perfiles proteicos asociados con las distintas condiciones experimentales. Este análisis es crucial para discernir cómo varía la composición de la CP en función del tipo de NPs (desnuda o cargada en exosomas) y el tiempo de incubación. En nuestro caso, el objetivo principal del análisis DE es identificar proteínas cuya abundancia cambia significativamente entre las NPs sin encapsular y los exosomas cargados con NPs, así como entre diferentes tiempos de incubación (5 minutos, 4 horas y 24 horas).

Los resultados del análisis DE, mostrados en la **Figura 43**, revelan patrones interesantes en la composición de la CP cuando se comparan los exosomas derivados de células U251-MG cargados con las diferentes NPs (NPs-Exos^{U251-MG}) con los Exos^{U251-MG} vacíos y las NPs sin encapsular. Estos resultados sugieren que la formación y composición de la CP pueden variar significativamente según el tipo de NPs y el tiempo de incubación. Para los Pd-Exos^{U251-MG}, los datos indican que inicialmente hay mayores diferencias en la composición de la CP en comparación con los Exos^{U251-MG}. Sin embargo, estas diferencias disminuyen con el tiempo, y la CP de los Pd-Exos^{U251-MG} se asemeja cada vez más a la de los Exos^{U251-MG}. La disminución en las diferencias puede reflejar un equilibrio dinámico donde la CP formada se vuelve más estable y menos distintiva a medida que las proteínas se reorganizan y ajustan su afinidad con el tiempo. En el caso de los Pt-Exos^{U251-MG}, se observa una tendencia similar: con el tiempo, la CP de los Pt-Exos^{U251-MG} muestra menores diferencias en comparación con los Exos^{U251-MG} vacíos, aunque el número de proteínas presentes en la CP sigue siendo mayor en los Pt-Exos^{U251-MG} en comparación con los Pd-Exos^{U251-MG}. Esto sugiere que, aunque la composición de la CP de los Pt-Exos^{U251-MG} tiende a aproximarse a la de los exosomas vacíos, aún mantiene un perfil proteico más complejo y diverso.

En contraste, para los Au-Exos^{U251-MG}, el análisis revela que la principal diferencia en la composición de la CP se observa entre las AuNPs (AuCit NPs y AuLys NPs) y los Au-Exos^{U251-MG}. La razón de esta diferencia podría ser que las AuNPs interactúan de manera diferente con las proteínas en el medio en comparación con las Au-Exos^{U251-MG}, afectando así la formación de la CP.

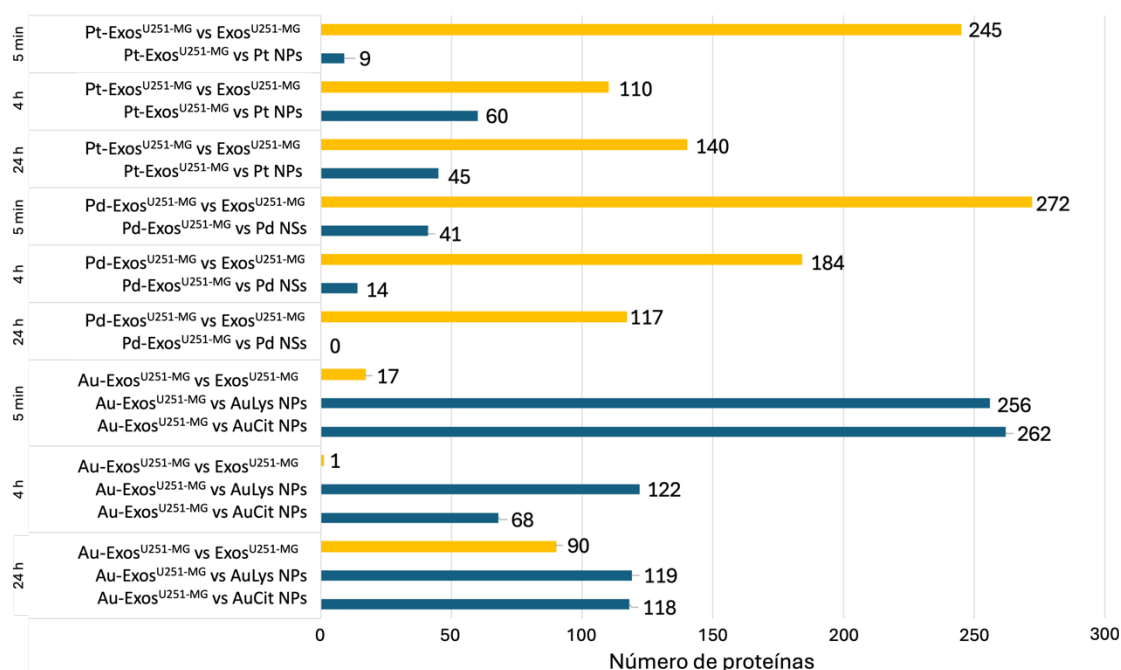


Figura 43. Análisis de expresión diferencial evaluado en dos tipos de contrastes. Por un lado, de color azul los Exos^{U251-MG} versus las NPs sin encapsular a tiempo fijo y a tipo de partícula fijo y por otro lado, de color naranja, los NPs-Exos^{U251-MG} frente a Exos^{U251-MG} vacíos a tiempo fijo.

Finalmente, se procedió a la generación de diagramas de Venn. Se construyeron con las listas de proteínas obtenidas, que ya habían sido rigurosamente filtradas y analizadas. Los diagramas de Venn que ilustran la comparación entre las proteínas de la CP de las NPs y los exosomas se encuentran en el **Anexo 3**. Estos diagramas se elaboraron para diferentes niveles de expresión (50%, 75% y 90%), y permiten visualizar las intersecciones entre las proteínas identificadas en las distintas condiciones. La representación gráfica facilita la comparación de proteínas comunes y exclusivas entre las diversas NPs y exosomas. En este caso, se ha trabajado con la lista de proteínas comunes obtenidas para los valores del 90%, ya que este nivel proporciona una mayor relevancia biológica al enfocarse en las proteínas más significativamente expresadas.

La **tabla 3** presenta el porcentaje de proteínas compartidas entre los diferentes tipos de vectores comparados. Se observa que los Exos^{U251-MG} vacíos y los NPs-Exos^{U251-MG}, en todos los tiempos evaluados, tienen una cantidad significativa de proteínas en común. Sin embargo, al comparar las proteínas comunes entre los NPs-Exos^{U251-MG} y las NPs sin encapsular, esta cantidad disminuye. Al comparar NPs-Exos^{U251-MG} respecto a las NPs sin encapsular, se evidencia que las proteínas que se adhieren a la superficie de los exosomas son completamente distintas, ya que no se encuentran proteínas comunes con las presentes en la CP de las NPs sin encapsular. Por otro lado, al comparar los NPs-Exos^{U251-MG} con los Exos^{U251-MG} vacíos, el porcentaje de proteínas compartidas es considerablemente mayor, lo que indica que la formación de la CP es similar a la de los Exos^{U251-MG}. Es deseable que el porcentaje de proteínas compartidas sea lo más alto posible, para asegurar que las proteínas presentes en los exosomas vacíos se mantengan en los exosomas cargados, evitando así la modificación de la superficie de los exosomas vacíos durante el proceso de carga.

Tabla 3. Porcentaje de proteínas compartidas entre los diferentes vectores comparados a distintos tiempos.

	Control (0 horas)	4 horas	24 horas
Pd-Exos^{U251-MG} vs Exos^{U251-MG}	40 %	42 %	66 %
Pd-Exos^{U251-MG} vs PdNSs	0 %	24 %	41 %
Pt-Exos^{U251-MG} vs Exos^{U251-MG}	69 %	41 %	53 %
Pt-Exos^{U251-MG} vs PtNPs	0 %	33 %	31 %
Au-Exos^{U251-MG} vs Exos^{U251-MG}	57 %	72 %	47 %
Au-Exos^{U251-MG} vs AuNPs (AuCit NPs y AuLys NPs)	0 %	31 %	22 %

Con los resultados obtenidos, el objetivo fue clasificar las proteínas comunes identificadas según una categorización específica: **proteínas del sistema inmunitario, proteínas del sistema de complemento, apolipoproteínas, proteínas de coagulación, histonas, proteínas de fase aguda y otras**, de acuerdo con la bibliografía [70].

La **Figura 44** muestra diagramas circulares que ilustran la clasificación de las proteínas comunes identificadas entre los diferentes vectores comparados en distintos tiempos. Se observa una tendencia clara: a medida que el tiempo avanza, aumenta la expresión de proteínas del complemento, apolipoproteínas, proteínas del sistema inmunitario y de coagulación, mientras que la cantidad de proteínas sin clasificar disminuye significativamente. Es probable que las proteínas cuya expresión aumenta sean las involucradas en la formación de la CP. Estos datos sugieren que este tipo de proteínas desempeñan un papel predominante en la formación de la CP, tal como se ha descrito en la literatura [70]. Cabe destacar que, para todas las comparaciones realizadas, no se obtuvieron proteínas comunes clasificables como histonas.

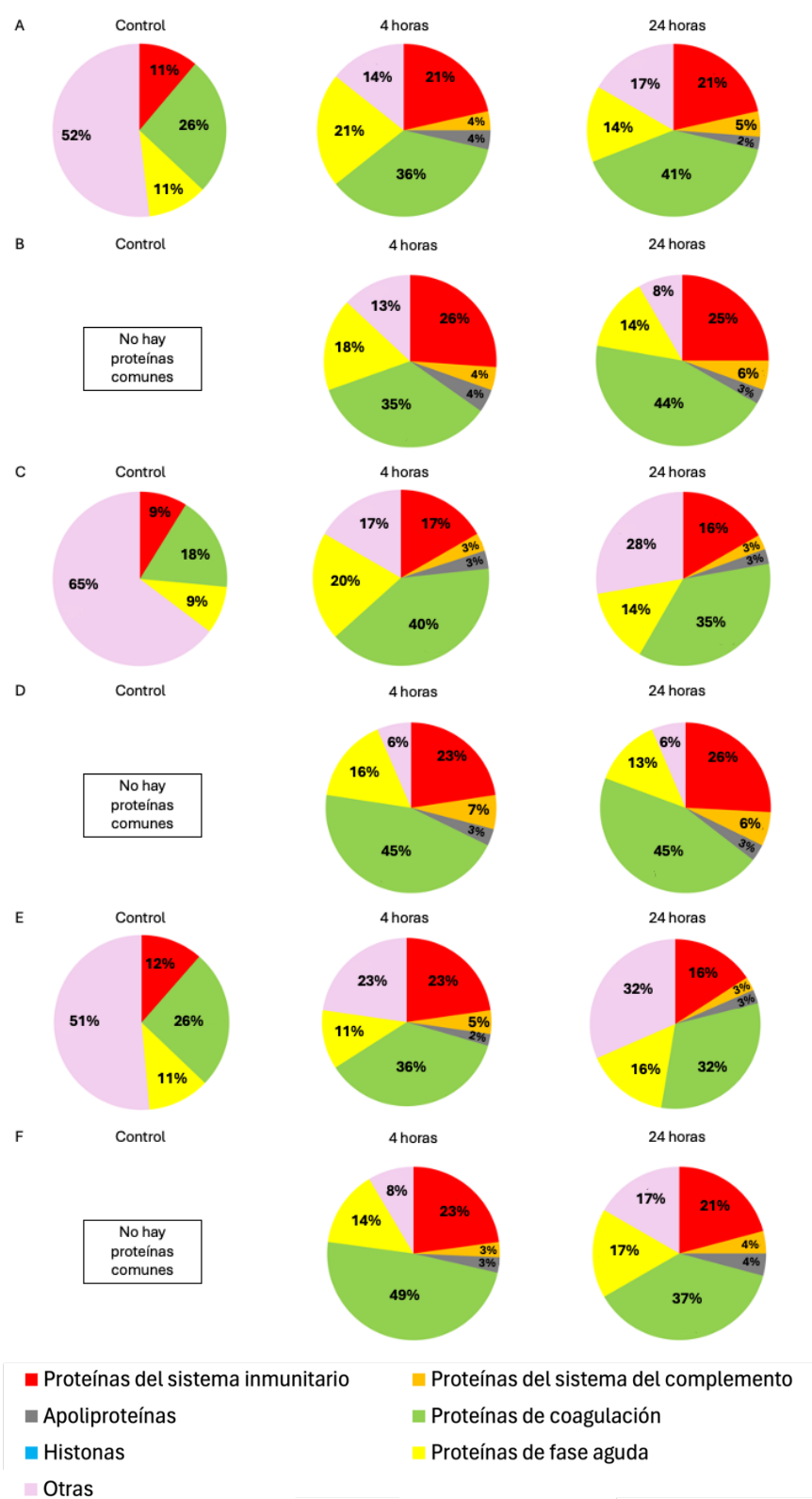


Figura 44. Gráficos circulares que muestran la clasificación de las proteínas compartidas entre A) los Pd-Exos^{U251-MG} y los Exos^{U251-MG} B) los Pd-Exos^{U251-MG} y las PdNs C) los Pt-Exos^{U251-MG} y los Exos^{U251-MG} D) los Pt-Exos^{U251-MG} y las PtNPs E) los Au-Exos^{U251-MG} y los Exos^{U251-MG} F) los Au-Exos^{U251-MG} y las AuNPs (AuCit NPs y AuLys NPs) a distintos tiempos

En resumen, los resultados sugieren que las proteínas del sistema inmunitario, del complemento y de coagulación juegan un papel fundamental en la formación de la CP en NPs-Exos^{U251-MG}. Estas proteínas parecen ser las principales responsables de las interacciones biológicas que se producen en la superficie de los exosomas tras la carga con NPs. Además, se observa que la composición proteica de los exosomas se mantiene relativamente constante tras la carga de NPs, evidenciando que el proceso de carga de exosomas con las NPs desarrollado en este TFM no altera significativamente la superficie del exosoma, que es crucial para preservar su funcionalidad biológica y su capacidad para interactuar de manera predecible con su entorno manteniendo intacta su superficie para llevar a cabo el reconocimiento activo y selectivo de las células tumorales diana.

4.5. Evaluación de la internalización de nanopartículas y exosomas en distintas líneas celulares

En la última fase del trabajo, se determinó si la CP formada alrededor de los diferentes vectores estudiados afectaba a su internalización en células diana o en células del sistema inmunitario como los macrófagos. De esta manera, se estudió si la encapsulación de las NPs en el interior de los exosomas favorecía su acumulación en las células tumorales diana evitando su reconocimiento por células del sistema inmunitario. Además, nos permitió relacionar los resultados obtenidos previamente relativos a la formación de la CP, agregación y estabilidad de los diferentes vectores con su capacidad para acumularse en las células diana.

En los experimentos de internalización, se utilizaron dos tipos de líneas celulares representativas: la línea celular tumoral U251-MG, que también es la fuente de los exosomas utilizados en este estudio, y los macrófagos RAW 264.7, un modelo de línea celular fagocítica. La capacidad de internalización de las NPs y de los NPs-Exos^{U251-MG} se evaluó mediante técnicas de microscopía confocal y análisis por MP-AES. Estos métodos nos permitieron determinar cómo varía la internalización en función de la formulación de las NPs y el papel que juegan los exosomas como vehículos de entrega, comparando la eficacia de la internalización en las células diana frente a las células fagocíticas que representan un potencial mecanismo de eliminación de las partículas en el organismo.

En primer lugar se llevó a cabo el estudio por microscopía confocal. Tal y como se ha descrito anteriormente, las fibras de actina del citoesqueleto se marcaron con faloidina (en verde). La tinción de los núcleos se realizó con Hoechst (azul) y los aglomerados de partículas se observaron directamente por reflexión (rojo). Las proyecciones ortogonales realizadas a partir de las adquisiciones en dirección Z, muestran la distribución de ambos tipos de NPs en el citoplasma celular tras 6 h y 24 h de incubación. En la **Figura 45 A** se presenta el estudio de la internalización de las PdNSs y de los Pd-Exos^{U251-MG} en las células tumorales diana U251-MG, evaluado a las 6 horas y 24 horas. La **Figura 45 B** muestra los resultados de la internalización en los macrófagos RAW 264.7. La microscopía confocal revela que, en los macrófagos RAW 264.7, las PdNSs libres se internalizan en mayor cantidad que los Pd-Exos^{U251-MG}, sugiriendo que los exosomas reducen la captación de las PdNSs por estas células fagocíticas. En contraste, en las células tumorales U251-MG, se observa una mayor internalización de los Pd-Exos^{U251-MG} en comparación con las PdNSs libres.

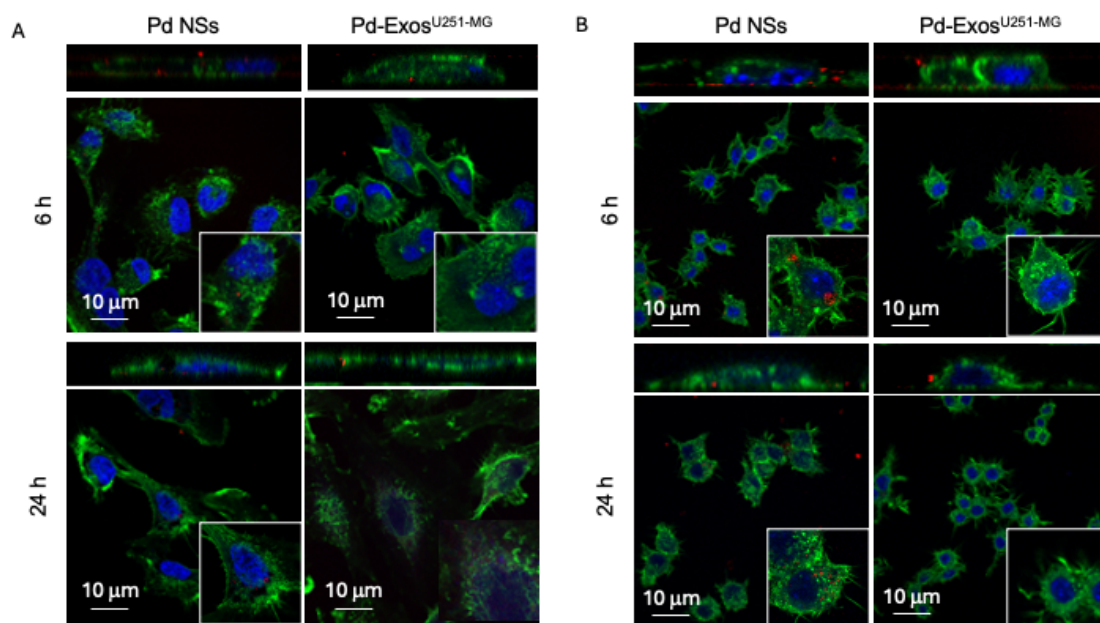


Figura 45. Estudio de internalización de PdNSs y de los Pd-Exos en A) células U251-MG y B) macrófagos RAW 264.7 por microscopía confocal. Los puntos rojos se corresponden con agregados de partículas en el interior celular.

Estos hallazgos se corroboran con el análisis estadístico de MP-AES mostrado en la **Figura 46**. Los datos revelan que, en ambos intervalos de tiempo (tanto tras ser incubados durante 6 h como 24 h), se detectó una mayor cantidad de Pd internalizado en los macrófagos cuando se utilizan PdNSs libres, mientras que, cuando se utilizan Pd-Exos^{U251-MG}, la cantidad de Pd internalizado es significativamente mayor en las células U251-MG en comparación con los macrófagos RAW 264.7. En concordancia a la **sección 4.4**, se ha observado que la formación de la CP de los Pd-Exos^{U251-MG} ocurre a un ritmo más rápido en comparación con otros metales. Esto podría explicar la falta de diferencias en la internalización entre las células U251-MG y los macrófagos RAW 264.7 después de 24 horas, dado que la corona ya se ha formado, igualando el comportamiento de internalización entre las NPs sin encapsular y encapsuladas.

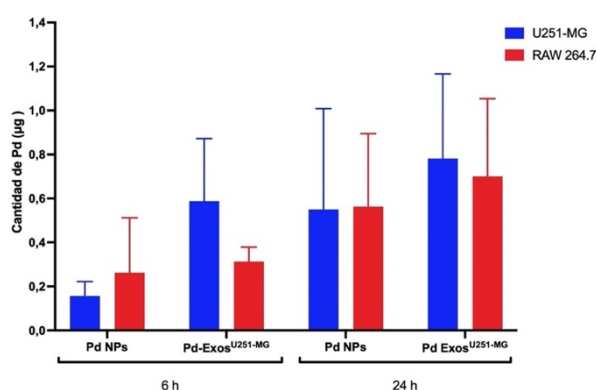


Figura 46. Gráfica que muestra el análisis estadístico de la cantidad de Pd internalizado en células U251-MG y en macrófagos RAW 264.7 utilizando MP-AES.

En el caso de las PtNPs, en la **sección 4.4.2.** del estudio se ha demostrado que los Pt-Exos^{U251-MG} presentan diferencias significativas en la formación de la CP en comparación con los otros NPs-Exos^{U251-MG}. Este hallazgo también se refleja en el análisis proteómico descrito en la **sección 4.4.3.** Las PtNPs, tanto libres como encapsuladas, tienden a formar una CP con características distintas a las observadas con las PdNSs y, como se detallará a continuación, también difieren de las AuNPs. Dado que PtNPs son extremadamente pequeñas, es probable que queden más expuestas en la membrana de los exosomas, lo que resulta en una mayor internalización de las PtNPs libres en comparación con las encapsuladas. Este patrón se puede observar en las imágenes del confocal de la **Figura 47** y en los datos estadísticos de MP-AES reflejados en la **Figura 48.** Cabe destacar que el análisis y la comparación en la cinética de internalización de las PtNPs y los Pt-Exos^{U251-MG} es más complejo debido al tamaño significativamente menor de las PtNPs sin encapsular, lo que facilita su internalización [71]. No obstante, se observa una tendencia en la que los Pt-Exos^{U251-MG} se internalizan en mayor medida en las células U251-MG que en las RAW 264.7.

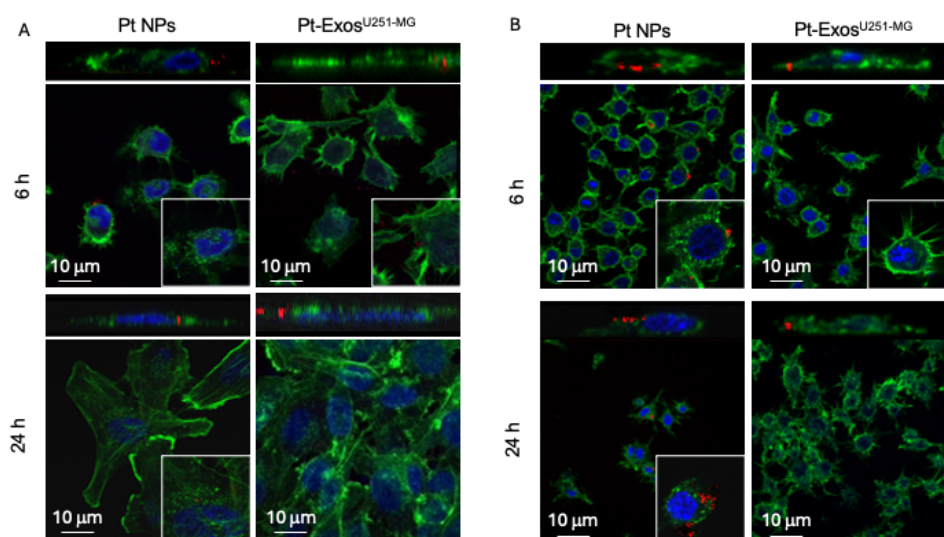


Figura 47. Estudio de internalización de PtNPs y de los Pt-Exos^{U251-MG} en A) células U251-MG y B) macrófagos RAW 264.7 por microscopía confocal. Los puntos rojos se corresponden con agregados de partículas en el interior celular.

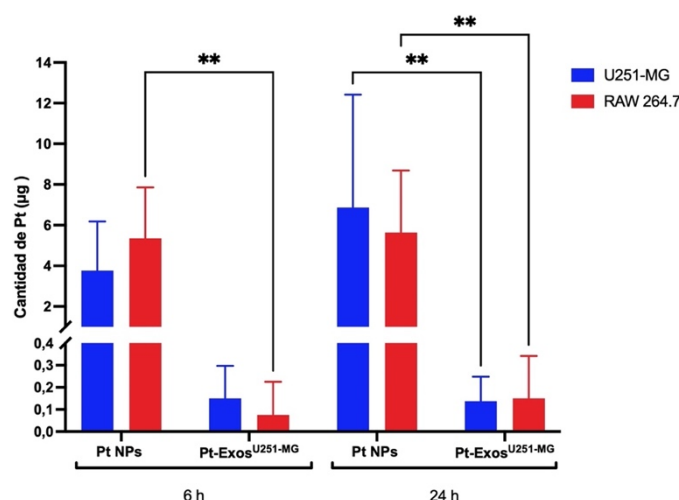


Figura 48. Gráfica que muestra el análisis estadístico de la cantidad de Pt internalizado en células U251-MG y en macrófagos RAW 264.7 utilizando MP-AES.

Al igual que en los casos anterior, la internalización de las AuCit NPs, AuLys NPs se comparó con la de los Au-Exos^{U251-MG}, a través de microscopía confocal, cuyas imágenes se presentan en la **Figura 49**. Las imágenes muestran claramente como, las AuLys NPs se internalizan en mayor medida tanto en las células U251-MG como en los macrófagos comparado con las AuCit NPs y con los Au-Exos^{U251-MG}. Estos resultados pueden atribuirse a la carga superficial más negativas de las AuNPs cuando estas son funcionalizadas con la lisina. Sin embargo, comparando las AuCit NPs con los Au-Exos^{U251-MG}, los resultados de microscopía confocal reflejan una tendencia de una mayor internalización de las AuCit NPs en las células tumorales U251-MG cuando las AuNPs son vehiculizadas en el interior de los exosomas. Y en paralelo, se evidencia como la internalización de los Au-Exos^{U251-MG} es menor en los macrófagos RAW 264.7 comparado con las células tumorales.

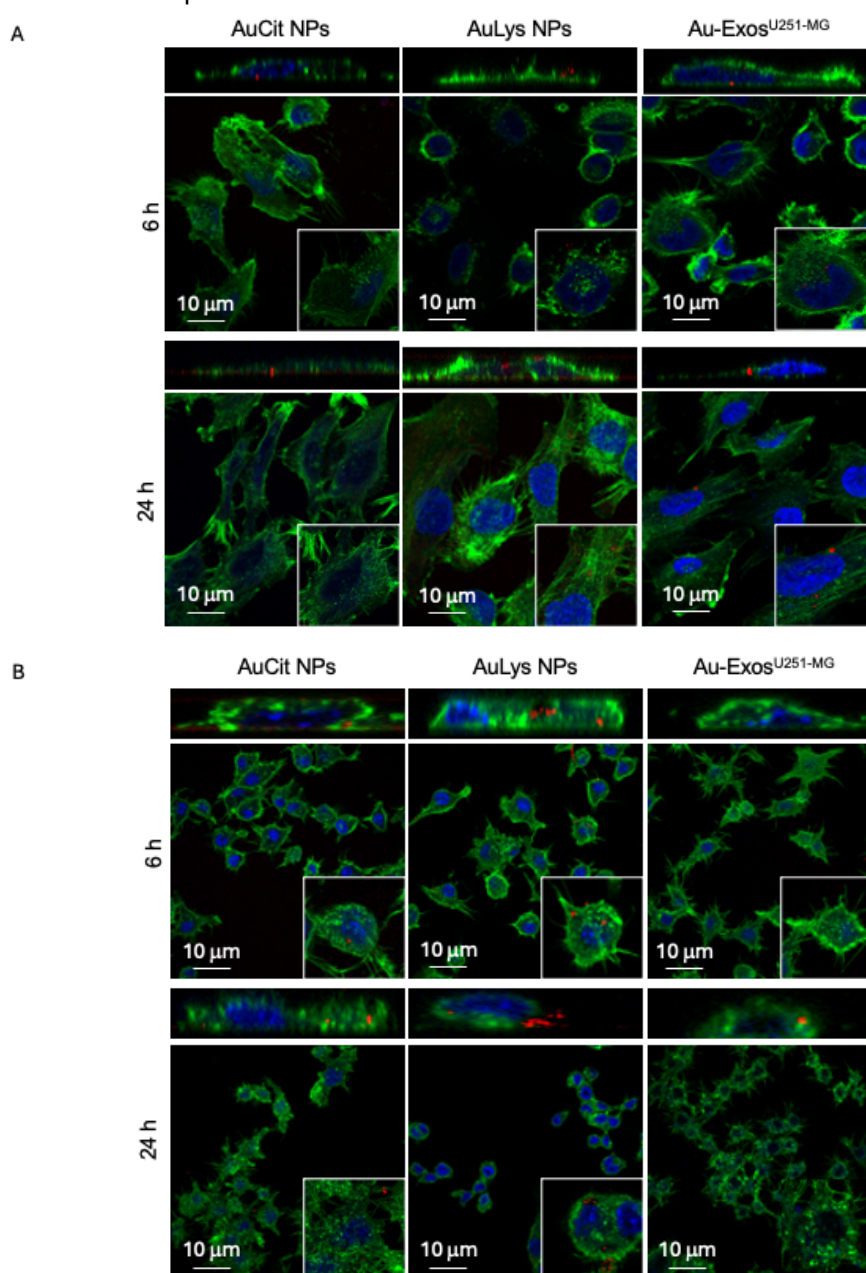


Figura 49. Estudio de internalización de AuCit NPs, AuLys NPs y de los Au-Exos^{U251-MG} en A) células U251-MG y B) macrófagos RAW 264.7 por microscopía confocal. Los puntos rojos se corresponden con agregados de partículas en el interior celular.

Los resultados obtenidos por MP-AES, presentados en la **Figura 50**, son similares a los observados con las PdNSs y en concordancia con las imágenes de microscopia confocal, evidenciando una menor internalización de los Au-Exos^{U251-MG} en los macrófagos RAW 264.7 en comparación con las células tumorales U251-MG. Este patrón sugiere que los Au-Exos^{U251-MG} son menos reconocidos y, por lo tanto, menos internalizados por los macrófagos, lo que podría reflejar un menor riesgo de activación y reconocimiento del sistema inmunitario. En cuanto a las AuNPs sin encapsular, los resultados muestran una mayor internalización de Au en las AuLys NPs, con diferencias significativas a las 6 horas que tienden a desaparecer a las 24 horas. Una posible explicación de este comportamiento podría ser que las AuLys NPs tienen una superficie zwitteriónica y anfílica, lo que podría facilitar su interacción con las membranas celulares y, por ende, su mayor internalización, como se explicó en la **sección 4.1.3**. Por otro lado, las AuCit NPs siguen el patrón de internalización observado con las PdNSs, mostrando una tendencia a una mayor internalización en los macrófagos RAW 264.7 en comparación con las células tumorales U251-MG. Este comportamiento sugiere que las AuCit NPs son más propensas a ser reconocidas y fagocitadas por las células del sistema inmunitario comparado con las NPs encapsuladas en el interior de los exosomas. En conclusión, se destaca que las AuCit NPs y las AuLys NPs presentan diferencias en la internalización atribuidas a su diferente carga y composición química del estabilizante usado. Las partículas recubiertas con lisina se internalizan en mayor cantidad en ambas líneas celulares, lo que se alinea con la literatura existente que señala que las partículas con cargas positivas se internalizan más fácilmente debido a la atracción entre la carga negativa de la membrana plasmática de las células y la carga positiva de las partículas[72]. No obstante, en el caso de los Au-Exos^{U251-MG}, la comparación es más compleja. A las 6 horas, la internalización es similar en ambas líneas celulares, pero a las 24 horas parece haber una tendencia en la que las AuCit NPs muestran una internalización más alta en los macrófagos RAW 264.7. Sin embargo, en el caso de los exosomas, la situación se invierte, con una mayor internalización en las células U251-MG. Esta diferencia podría explicarse por la formación de la corona de proteínas, que según lo observado en la **sección 4.4**, es más similar a la de los exosomas control a las 24 horas.

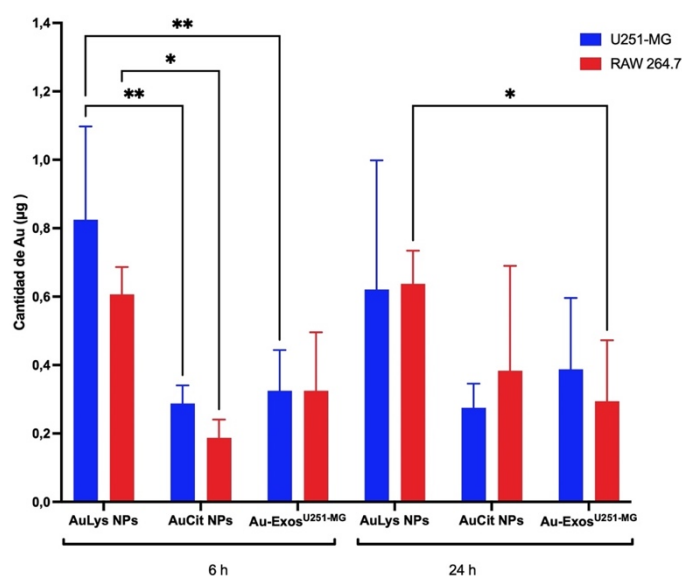


Figura 50. Gráfica que muestra el análisis estadístico de la cantidad de Au internalizado en células U251-MG y en macrófagos RAW 264.7 utilizando MP-AES.

En conclusión, si bien los resultados obtenidos mediante microscopia confocal y MP-AES son preliminares y deben ser replicados para su confirmación, estos van en concordancia con los datos obtenidos en las secciones anteriores relativos a la CP. A pesar de que la CP formada alrededor de los exosomas cargados con las diferentes NPs no es 100 % similar a la de los Exos^{U251-MG}, los porcentajes de proteínas comunes son significativamente más altos que los de los exosomas cargados con sus respectivas partículas sin encapsular. Los datos obtenidos en este trabajo integran de manera coherente los hallazgos proteómicos asociados a la caracterización de la CP formada alrededor de los diferentes vectores estudiados y los datos de internalización en diferentes líneas celulares, destacando la complejidad y la importancia de la CP en el desarrollo de estrategias terapéuticas en nanomedicina.

En concreto, se ha demostrado que las proteínas del sistema inmunitario, del complemento y de coagulación son cruciales en la formación de la CP en los exosomas, asegurando que la carga de NPs no altera significativamente la composición proteica de la superficie de los exosomas. Si bien, aunque la CP formada alrededor de los NPs-Exos^{U251-MG} compartía un porcentaje de proteínas comunes mucho más alto con los exosomas vacíos naturales que con las NPs sin encapsular, esta CP no fue 100 % idéntica. Por otro lado, los estudios de internalización revelan que la formación de la CP influye directamente en la manera en que las NPs y los exosomas cargados son internalizados por distintos tipos de células. Las variaciones en la internalización entre distintas líneas celulares resaltan la influencia del recubrimiento y la composición proteica en este proceso. Además, los resultados con NPs de distintos tamaños subrayan que, este factor también influye en la internalización, lo que sugiere que tanto la CP como el tamaño de las partículas juegan un papel importante en la interacción con las células. En conjunto, los hallazgos obtenidos en este estudio mejoran la comprensión de cómo las NPs y exosomas interactúan con su entorno biológico, destacando la importancia de la CP en la eficacia y especificidad de la internalización celular, siendo este conocimiento crucial para el desarrollo de terapias basadas en exosomas y NPs.

En resumen, este trabajo ha sido pionero en estudiar como la carga de diferentes nanomateriales no sólo no afecta a las características fisicoquímicas ni bioquímicas de los exosomas, sino también a su CP y abre una nueva línea de investigación para el desarrollo de estrategias que nos permitan profundizar en el análisis detallado de la CP exosomal (hasta ahora no estudiada) para desarrollar estrategias de direccionamiento activo de NPs. Esto es esencial para preservar la funcionalidad biológica del exosoma y su capacidad para interactuar de manera predecible con su entorno, con el objetivo de acelerar su traslación al ámbito clínico.

5. CONCLUSIONES

Este trabajo ha demostrado que los exosomas cargados con NPs metálicas tienen un gran potencial como vectores de terapias dirigidas contra células tumorales. Se han cumplido los objetivos establecidos, avanzando en la comprensión de los mecanismos que determinan la eficacia de los exosomas como vehículos terapéuticos, así como en la optimización de la síntesis y caracterización de NPs para aplicaciones biomédicas. Estos hallazgos abren la puerta a nuevas estrategias de tratamiento más selectivas y eficaces contra el cáncer, minimizando la captura por parte del sistema inmunitario y maximizando la eficacia en células tumorales diana.

Las conclusiones obtenidas en este trabajo responden a cada una de las tareas específicas planteadas en la sección 2, realizadas de manera satisfactoria. a continuación, se resumen las conclusiones principales obtenidas:

1. Síntesis y caracterización fisicoquímica de nanopartículas de diferentes metales:

Se ha logrado una síntesis efectiva de las PdNSs y PtNPs usando CO como agente reductor de diferentes precursores metálicos, cuyas propiedades físicas y químicas fueron confirmadas mediante una amplia batería de métodos fisicoquímicos, cumpliendo con las expectativas y concordando con los datos reportados en la bibliografía. Sin embargo, el uso de PVP como estabilizante en la síntesis de AuNPs no dio lugar a resultados satisfactorios, por lo que se optó por utilizar estabilizantes alternativos como el citrato y la lisina. Con estos nuevos estabilizantes, se obtuvieron AuNPs con propiedades más estables y características morfológicas más homogéneas, evidenciando el papel crucial que juegan los estabilizantes en la síntesis de nanomateriales.

2. Aislamiento y caracterización de exosomas de células tumorales U251-MG a partir de cultivos celulares:

Mediante ciclos sucesivos de ultracentrifugación se consiguió aislar y purificar de manera exitosa exosomas derivados de células U251-MG. Estos exosomas fueron caracterizados por métodos fisicoquímicos y biológicos confirmando su naturaleza exosomal. La detección de proteínas exosomales específicas en su superficie, de acuerdo con los estándares bibliográficos, valida que los exosomas son aptos para su utilización como vehículos de entrega de NPs terapéuticas.

3. Implementación de una estrategia dirigida a encapsular eficazmente las nanopartículas sintetizadas en los exosomas aislados:

El uso de CO como agente reductor de diferentes precursores metálicos incubados en el interior de exosomas permitió la generación *in situ* de NPs dentro de mismos. Este método preserva la integridad, morfología y funcionalidad de los exosomas, además de ser versátil y adaptable para sintetizar diferentes tipos de NPs. Se destaca que esta técnica no requiere etapas adicionales de purificación o lavado, lo cual simplifica el proceso y aumenta su potencial para aplicaciones biomédicas. La ausencia de productos tóxicos en esta metodología también evidencia su seguridad y eficiencia en la producción de exosomas cargados con NPs terapéuticas.

4. Estudio del comportamiento biológico y fisicoquímico de todos los nanomateriales sintetizados en este trabajo:

Se ha logrado un estudio detallado de la CP que se forma alrededor de las diferentes NPs y exosomas. Este análisis ha revelado diferencias significativas en la composición de la CP cuando las NPs son puestas en contacto con un fluido biológico tanto sin encapsular como encapsuladas en el interior de los exosomas, evidenciando que la CP puede influir de manera importante en la biodistribución, el reconocimiento de las células tumorales diana y en la captación por el sistema inmunitario de estos nanomateriales. En particular, se ha observado como cuando las NPs estaban encapsuladas en los exosomas, su CP era mucho más similar a la de los exosomas naturales vacíos que a las NPs artificiales sin encapsular. Además, se logró clasificar las principales proteínas presentes en la CP para describir las principales familias de proteínas implicadas en dicha CP.

5. Evaluación de la internalización y captura selectiva en células tumorales y macrófagos para determinar su capacidad de direccionamiento selectivo como agentes terapéuticos contra el cáncer:

Los estudios de internalización han demostrado que los Exos^{U251-MG} cargados con NPs tienden a ser internalizados preferentemente por células tumorales U251-MG respecto a los macrófagos RAW 264.7 (comparado con las NPs sin encapsular). Este patrón sugiere que los exosomas pueden reducir el reconocimiento y la fagocitosis por los macrófagos presentes en el sistema inmunitario, lo que los convierte en vehículos potencialmente eficaces para maximizar la entrega selectiva de terapias en la diana tumoral. Además, se ha observado una menor internalización de los Pt-Exos^{U251-MG} comparado con los exosomas cargados con las otras NPs, un hecho que podría estar vinculado al diferente comportamiento de la CP generada en estos exosomas cuando son puestos en contacto en fluidos biológicos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. Gavas, S. Quazi, and T. M. Karpiński, "Nanoparticles for Cancer Therapy: Current Progress and Challenges," *Nanoscale Res Lett*, vol. 16, no. 1, p. 173, Dec. 2021, doi: 10.1186/s11671-021-03628-6.
- [2] Organización Mundial de la Salud, "Global cancer burden growing amidst mounting need for services." Accessed: Aug. 27, 2024. [Online]. Available: Global cancer burden growing amidst mounting need for services
- [3] Sociedad Española de Oncología Médica, "El cáncer en cifras." Accessed: Aug. 27, 2024. [Online]. Available: <https://seom.org/prensa/el-cancer-en-cifras>
- [4] I. Jovčevska and S. Muyldermans, "The Therapeutic Potential of Nanobodies," *BioDrugs*, vol. 34, no. 1, pp. 11–26, Feb. 2020, doi: 10.1007/s40259-019-00392-z.
- [5] R. R. Balandrán Quintana and A. M. Mendoza Wilson, "Un acercamiento a los fundamentos y aplicaciones de la nanotecnología," *Tecnociencia Chihuahua*, vol. 15, no. 1870–6606, pp. 167–185, 2021.
- [6] N. Pájaro Castro, J. Olivero Verbel, and J. Redondo Padilla, "Nanotecnología aplicada a la medicina," *Revista Guillermo de Ockham*, vol. 11, no. 1, p. 125, Jun. 2013, doi: 10.21500/22563202.606.
- [7] M. L. Etheridge, S. A. Campbell, A. G. Erdman, C. L. Haynes, S. M. Wolf, and J. McCullough, "The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products," *Nanomedicine*, vol. 9, no. 1, pp. 1–14, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.nano.2012.05.013.
- [8] Y. Rojas-Aguirre, K. Aguado-Castrejón, and I. González-Méndez, "La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer?," *Educación Química*, vol. 27, no. 4, pp. 286–291, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.eq.2016.07.002.
- [9] M. Vert *et al.*, "Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012)," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 84, no. 2, pp. 377–410, Jan. 2012, doi: 10.1351/PAC-REC-10-12-04.
- [10] P. Boisseau and B. Loubaton, "Nanomedicine, nanotechnology in medicine," *C R Phys*, vol. 12, no. 7, pp. 620–636, Aug. 2011, doi: 10.1016/j.crhy.2011.06.001.
- [11] D. Mundekkad and W. C. Cho, "Nanoparticles in Clinical Translation for Cancer Therapy," *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 3, p. 1685, Feb. 2022, doi: 10.3390/ijms23031685.
- [12] S. Bakshi, A. Zakharchenko, S. Minko, D. M. Kolpashchikov, and E. Katz, "Towards Nanomaterials for Cancer Theranostics: A System of DNA-Modified Magnetic Nanoparticles for Detection and Suppression of RNA Marker in Cancer Cells," *Magnetochemistry*, vol. 5, no. 2, p. 24, Apr. 2019, doi: 10.3390/magnetochemistry5020024.
- [13] H. Maeda, K. Tsukigawa, and J. Fang, "A Retrospective 30 Years After Discovery of the Enhanced Permeability and Retention Effect of Solid Tumors: Next-Generation Chemotherapeutics and Photodynamic Therapy—Problems, Solutions, and Prospects," *Microcirculation*, vol. 23, no. 3, pp. 173–182, Apr. 2016, doi: 10.1111/micc.12228.

- [14] F. Danhier, O. Feron, and V. Préat, "To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery," *Journal of Controlled Release*, vol. 148, no. 2, pp. 135–146, Dec. 2010, doi: 10.1016/j.jconrel.2010.08.027.
- [15] M. L. Pinzón-Daza and Asociación Colombiana para el Avance de la Ciencia, "Un 'caballo de troya' contra el tumor cerebral," *Innovación y ciencia*, vol. 11, no. 0121–5140, pp. 46–51, 2014, Accessed: Aug. 27, 2024. [Online]. Available: https://innovacionyciencia.com/revistas_pdf/2014-4.pdf
- [16] B. György *et al.*, "Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 68, no. 16, pp. 2667–2688, Aug. 2011, doi: 10.1007/s00018-011-0689-3.
- [17] G. van Niel, G. D'Angelo, and G. Raposo, "Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 19, no. 4, pp. 213–228, Apr. 2018, doi: 10.1038/nrm.2017.125.
- [18] B. K. Thakur *et al.*, "Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection," *Cell Res*, vol. 24, no. 6, pp. 766–769, Jun. 2014, doi: 10.1038/cr.2014.44.
- [19] S. Staubach, H. Razawi, and F. Hanisch, "Proteomics of MUC1-containing lipid rafts from plasma membranes and exosomes of human breast carcinoma cells MCF-7," *Proteomics*, vol. 9, no. 10, pp. 2820–2835, May 2009, doi: 10.1002/pmic.200800793.
- [20] M. Colombo, G. Raposo, and C. Théry, "Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles," *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 30, no. 1, pp. 255–289, Oct. 2014, doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
- [21] M. Sancho Albero, S. Ramiro, J. Martín Duque, and M. del Pilar, "Vehículos híbridos formados por exosomas y nanopartículas. Aplicaciones en terapia y diagnóstico del cáncer. / María Sancho Albero," 2020. [Online]. Available: <http://zaguan.unizar.es>
- [22] V. H. Nguyen and B.-J. Lee, "Protein corona: a new approach for nanomedicine design," *Int J Nanomedicine*, vol. Volume 12, pp. 3137–3151, Apr. 2017, doi: 10.2147/IJN.S129300.
- [23] M. Mahmoudi, M. P. Landry, A. Moore, and R. Coreas, "The protein corona from nanomedicine to environmental science," Jul. 01, 2023, *Nature Research*. doi: 10.1038/s41578-023-00552-2.
- [24] C. E. de Castro *et al.*, "The Protein Corona Conundrum: Exploring the Advantages and Drawbacks of its Presence around Amphiphilic Nanoparticles," *Bioconj Chem*, vol. 31, no. 11, pp. 2638–2647, Nov. 2020, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00564.
- [25] M. Heidarzadeh, A. Zarebkohan, R. Rahbarghazi, and E. Sokullu, "Protein corona and exosomes: new challenges and prospects," Dec. 01, 2023, *BioMed Central Ltd*. doi: 10.1186/s12964-023-01089-1.
- [26] A. Ghodasara, A. Raza, J. Wolfram, C. Salomon, and A. Popat, "Clinical Translation of Extracellular Vesicles," *Adv Healthc Mater*, vol. 12, no. 28, Nov. 2023, doi: 10.1002/adhm.202301010.

- [27] M. Sancho-Albero *et al.*, "Cancer-derived exosomes loaded with ultrathin palladium nanosheets for targeted bioorthogonal catalysis," *Nat Catal*, vol. 2, no. 10, pp. 864–872, Sep. 2019, doi: 10.1038/s41929-019-0333-4.
- [28] V. Sebastian, C. D. Smith, and K. F. Jensen, "Shape-controlled continuous synthesis of metal nanostructures," *Nanoscale*, vol. 8, no. 14, pp. 7534–7543, 2016, doi: 10.1039/C5NR08531D.
- [29] L. Herrero *et al.*, "High surface coverage of a self-assembled monolayer by *in situ* synthesis of palladium nanodeposits," *Nanoscale*, vol. 9, no. 35, pp. 13281–13290, 2017, doi: 10.1039/C7NR03365F.
- [30] A. M. Pérez-López *et al.*, "Bioorthogonal Uncaging of Cytotoxic Paclitaxel through Pd Nanosheet–Hydrogel Frameworks," *J Med Chem*, vol. 63, no. 17, pp. 9650–9659, Sep. 2020, doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c00781.
- [31] J. Dong, P. L. Carpinone, G. Pyrgiotakis, P. Demokritou, and B. M. Moudgil, "Synthesis of Precision Gold Nanoparticles Using Turkevich Method," *KONA Powder and Particle Journal*, vol. 37, no. 0, p. 2020011, Jan. 2020, doi: 10.14356/kona.2020011.
- [32] V. Sebastián, S.-K. Lee, C. Zhou, M. F. Kraus, J. G. Fujimoto, and K. F. Jensen, "One-step continuous synthesis of biocompatible gold nanorods for optical coherence tomography," *Chemical Communications*, vol. 48, no. 53, p. 6654, 2012, doi: 10.1039/c2cc32969g.
- [33] V. Amendola, R. Pilot, M. Frascioni, O. M. Maragò, and M. A. Iatì, "Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review," *Journal of Physics: Condensed Matter*, vol. 29, no. 20, p. 203002, May 2017, doi: 10.1088/1361-648X/aa60f3.
- [34] V. Sebastian *et al.*, "Nondestructive production of exosomes loaded with ultrathin palladium nanosheets for targeted bio-orthogonal catalysis," *Nat Protoc*, vol. 16, no. 1, pp. 131–163, Jan. 2021, doi: 10.1038/s41596-020-00406-z.
- [35] Thermo Fisher Scientific, "Pierce BCA Protein Assay Kit User Guide," *Pub. No. MAN0011430*, Rev. C00. Accessed: Aug. 14, 2024. [Online]. Available: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf
- [36] Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA), "Caracterización de materiales: Otras propiedades y técnicas." Accessed: Aug. 14, 2024. [Online]. Available: <https://inma.unizar-csic.es/investigacion/infraestructura-cientifica-del-inma/caracterizacion-de-materiales/otras-propiedades-y-tecnicas/>
- [37] M. B. Biotec, "Unless otherwise specifically indicated, Miltenyi Biotec products and services are for research use only and not for diagnostic or therapeutic use. MACSPlex EV Kit IO human Description 2 3." [Online]. Available: www.miltenyibiotec.com
- [38] T. F. Huzar, T. George, and J. M. Cross, "Carbon monoxide and cyanide toxicity: etiology, pathophysiology and treatment in inhalation injury," *Expert Rev Respir Med*, vol. 7, no. 2, pp. 159–170, Apr. 2013, doi: 10.1586/ers.13.9.
- [39] A. V. Hill, "The Combinations of Haemoglobin with Oxygen and with Carbon Monoxide. I," *Biochemical Journal*, vol. 7, no. 5, pp. 471–480, Oct. 1913, doi: 10.1042/bj0070471.

- [40] O. A. , M. P. Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (INSST), *Límites de exposición profesional para agentes químicos en España 2019*. [Online]. Available: <http://www.insst.es/catalogopublicaciones/>
- [41] M. Sancho-Albero, V. Sebastian, A. M. Perez-Lopez, P. Martin-Duque, A. Unciti-Broceta, and J. Santamaria, "Extracellular Vesicles-Mediated Bio-Orthogonal Catalysis in Growing Tumors," *Cells*, vol. 13, no. 8, p. 691, Apr. 2024, doi: 10.3390/cells13080691.
- [42] M. M. Özer, Y. Jia, Z. Zhang, J. R. Thompson, and H. H. Weitering, "Tuning the Quantum Stability and Superconductivity of Ultrathin Metal Alloys," *Science (1979)*, vol. 316, no. 5831, pp. 1594–1597, Jun. 2007, doi: 10.1126/science.1142159.
- [43] Y. Guo *et al.*, "Superconductivity Modulated by Quantum Size Effects," *Science (1979)*, vol. 306, no. 5703, pp. 1915–1917, Dec. 2004, doi: 10.1126/science.1105130.
- [44] A. R. Smith, K.-J. Chao, Q. Niu, and C.-K. Shih, "Formation of Atomically Flat Silver Films on GaAs with a 'Silver Mean' Quasi Periodicity," *Science (1979)*, vol. 273, no. 5272, pp. 226–228, Jul. 1996, doi: 10.1126/science.273.5272.226.
- [45] X. Huang *et al.*, "Freestanding palladium nanosheets with plasmonic and catalytic properties," *Nat Nanotechnol*, vol. 6, no. 1, pp. 28–32, Jan. 2011, doi: 10.1038/nnano.2010.235.
- [46] J. I. Garcia-Peiro, J. Bonet-Aleta, M. L. Tamayo-Fraile, J. L. Hueso, and J. Santamaria, "Platinum-based nanodendrites as glucose oxidase-mimicking surrogates," *Nanoscale*, vol. 15, no. 35, pp. 14399–14408, 2023, doi: 10.1039/D3NR02026F.
- [47] National Center for Biotechnology Information, "PubChem Compound Summary for CID 5962, Lysine.," 2024. Accessed: Aug. 27, 2024. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lysine>
- [48] PR. Selvakannan, S. Mandal, S. Phadtare, R. Pasricha, and M. Sastry, "Capping of Gold Nanoparticles by the Amino Acid Lysine Renders Them Water-Dispersible," *Langmuir*, vol. 19, no. 8, pp. 3545–3549, Apr. 2003, doi: 10.1021/la026906v.
- [49] H. Cai and P. Yao, "Gold nanoparticles with different amino acid surfaces: Serum albumin adsorption, intracellular uptake and cytotoxicity," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 123, pp. 900–906, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.10.042.
- [50] P. Li, M. Kaslan, S. H. Lee, J. Yao, and Z. Gao, "Progress in Exosome Isolation Techniques," *Theranostics*, vol. 7, no. 3, pp. 789–804, 2017, doi: 10.7150/thno.18133.
- [51] B. Basu and M. K. Ghosh, "Extracellular Vesicles in Glioma: From Diagnosis to Therapy," *BioEssays*, vol. 41, no. 7, Jul. 2019, doi: 10.1002/bies.201800245.
- [52] B. Vestad *et al.*, "Size and concentration analyses of extracellular vesicles by nanoparticle tracking analysis: a variation study," *J Extracell Vesicles*, vol. 6, no. 1, Dec. 2017, doi: 10.1080/20013078.2017.1344087.
- [53] T. Akagi, K. Kato, N. Hanamura, M. Kobayashi, and T. Ichiki, "Evaluation of desialylation effect on zeta potential of extracellular vesicles secreted from human prostate cancer cells by on-chip microcapillary electrophoresis," *Jpn J Appl Phys*, vol. 53, no. 6S, p. 06JL01, Jun. 2014, doi: 10.7567/JJAP.53.06JL01.

- [54] C. Théry *et al.*, “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*, vol. 7, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.
- [55] M. Sancho-Albero, A. Martín-Pardillos, L. Lujan, V. Sebastian, J. Santamaria, and P. Martín-Duque, “Exosomes loaded with ultrasmall Pt nanoparticles: a novel low-toxicity alternative to cisplatin,” *J Nanobiotechnology*, vol. 20, no. 1, p. 473, Nov. 2022, doi: 10.1186/s12951-022-01675-4.
- [56] M. M. Encabo-Berzosa *et al.*, “Polymer functionalized gold nanoparticles as nonviral gene delivery reagents,” *J Gene Med*, vol. 19, no. 6–7, p. e2964, Jun. 2017, doi: 10.1002/jgm.2964.
- [57] M. Sancho-Albero *et al.*, “Efficient encapsulation of theranostic nanoparticles in cell-derived exosomes: leveraging the exosomal biogenesis pathway to obtain hollow gold nanoparticle-hybrids,” *Nanoscale*, vol. 11, no. 40, pp. 18825–18836, 2019, doi: 10.1039/C9NR06183E.
- [58] M. Sancho-Albero, A. Medel-Martínez, and P. Martín-Duque, “Use of exosomes as vectors to carry advanced therapies,” *RSC Adv*, vol. 10, no. 40, pp. 23975–23987, 2020, doi: 10.1039/D0RA02414G.
- [59] S. W. Ferguson and J. Nguyen, “Exosomes as therapeutics: The implications of molecular composition and exosomal heterogeneity,” *Journal of Controlled Release*, vol. 228, pp. 179–190, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.02.037.
- [60] M. Sancho-Albero, V. Sebastian, A. M. Perez-Lopez, P. Martin-Duque, A. Unciti-Broceta, and J. Santamaria, “Extracellular Vesicles-Mediated Bio-Orthogonal Catalysis in Growing Tumors,” *Cells*, vol. 13, no. 8, p. 691, Apr. 2024, doi: 10.3390/cells13080691.
- [61] M. Sancho-Albero *et al.*, “Transfer of photothermal nanoparticles using stem cell derived small extracellular vesicles for in vivo treatment of primary and multinodular tumours,” *J Extracell Vesicles*, vol. 11, no. 3, Mar. 2022, doi: 10.1002/jev2.12193.
- [62] K. Ezzat *et al.*, “The viral protein corona directs viral pathogenesis and amyloid aggregation,” *Nat Commun*, vol. 10, no. 1, p. 2331, May 2019, doi: 10.1038/s41467-019-10192-2.
- [63] E. Nolte-‘t Hoen, T. Cremer, R. C. Gallo, and L. B. Margolis, “Extracellular vesicles and viruses: Are they close relatives?,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 113, no. 33, pp. 9155–9161, Aug. 2016, doi: 10.1073/pnas.1605146113.
- [64] M. Palviainen *et al.*, “Extracellular vesicles from human plasma and serum are carriers of extravesicular cargo—Implications for biomarker discovery,” *PLoS One*, vol. 15, no. 8, p. e0236439, Aug. 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0236439.
- [65] E. Á. Tóth *et al.*, “Formation of a protein corona on the surface of extracellular vesicles in blood plasma,” *J Extracell Vesicles*, vol. 10, no. 11, Sep. 2021, doi: 10.1002/jev2.12140.

- [66] E. I. Buzás, E. Á. Tóth, B. W. Sódar, and K. É. Szabó-Taylor, "Molecular interactions at the surface of extracellular vesicles," *Semin Immunopathol*, vol. 40, no. 5, pp. 453–464, Sep. 2018, doi: 10.1007/s00281-018-0682-0.
- [67] A. Németh *et al.*, "Antibiotic-induced release of small extracellular vesicles (exosomes) with surface-associated DNA," *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, p. 8202, Aug. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-08392-1.
- [68] B. W. Sódar *et al.*, "Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection," *Sci Rep*, vol. 6, no. 1, p. 24316, Apr. 2016, doi: 10.1038/srep24316.
- [69] R. Liam-Or *et al.*, "Cellular uptake and in vivo distribution of mesenchymal-stem-cell-derived extracellular vesicles are protein corona dependent," *Nat Nanotechnol*, vol. 19, no. 6, pp. 846–855, Jun. 2024, doi: 10.1038/s41565-023-01585-y.
- [70] S. Capolla *et al.*, "Surface antibody changes protein corona both in human and mouse serum but not final opsonization and elimination of targeted polymeric nanoparticles," *J Nanobiotechnology*, vol. 21, no. 1, p. 376, Oct. 2023, doi: 10.1186/s12951-023-02134-4.
- [71] W. S. Saw *et al.*, "Size-dependent effect of cystine/citric acid-capped confeito-like gold nanoparticles on cellular uptake and photothermal cancer therapy," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 161, pp. 365–374, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.10.064.
- [72] S. Behzadi *et al.*, "Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell," *Chem Soc Rev*, vol. 46, no. 14, pp. 4218–4244, 2017, doi: 10.1039/C6CS00636A.

ANEXOS

ANEXO 1. TÉCNICAS EMPLEADAS: FUNDAMENTO, EQUIPO Y USO

DLS y potencial zeta

La técnica de DLS es una herramienta crucial en la caracterización de partículas en suspensión, brindando información sobre su tamaño hidrodinámico y su carga superficial, conocida como potencial zeta. Permite analizar partículas en un amplio rango de tamaños, desde 0,3 nm hasta 10000 nm [1]. En este trabajo se ha utilizado un equipo Brookhaven 90 plus y el software ZetaPALS (Brookhaven Instruments Co.). La luz incidente se dispersa en diferentes intensidades según el movimiento browniano de las partículas en suspensión, permitiendo así la obtención del diámetro hidrodinámico de las partículas, proporcional a la velocidad del movimiento browniano a través de la relación de Stokes-Einstein [2]. Este diámetro hidrodinámico comprende tanto el tamaño de la partícula como el espesor de la capa de solvatación alrededor de ella, conocida como doble capa eléctrica.

El potencial zeta, por otro lado, indica la estabilidad de las partículas. Un alto potencial zeta implica una repulsión significativa entre las partículas en dispersión, otorgándoles estabilidad. En contraste, un potencial zeta cercano a cero sugiere que las fuerzas de atracción superan a las de repulsión, lo que puede llevar a la agregación de partículas[3]. 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, con varias réplicas para garantizar la precisión de los resultados.

En concreto, en este trabajo la técnica DLS se ha empleado para determinar el potencial zeta de las NPs, Exos^{U251-MG} y de los Exos^{U251-MG} cargados con las NPs.



Figura A.1. Equipo Brookhaven 90 plus. Obtenida de Artisan Technology Group [4].

MP-AES

El análisis por MP-AES, permite realizar un análisis multielemental de los metales presentes en una disolución, determinando metales, metaloides y no metales hasta niveles de $\mu\text{g/L}$. 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 [3]. 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 CCD de amplio intervalo.

Esta herramienta se ha utilizado para cuantificar la cantidad de NPs metálicas sintetizadas *in situ* en el interior de los exosomas. El análisis por MP-AES de todas las muestras requirió un tratamiento previo de digestión con agua regia ($\text{HNO}_3 + 3\text{HCl}$) seguido de una filtración con un filtro de $0,22\ \mu\text{m}$ antes de ser analizadas. La recta de calibrado se realizó con patrones de Pd, Pt y Au con concentraciones desde 10 a 0 ppm.



Figura A.2. Equipo MP-AES Agilent 4100. Obtenida de Agilent Technologies Life Sciences and Chemical [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 [3].

La técnica FTIR ha sido empleada para estudiar las estructuras químicas presentes en las diferentes NPs usadas en esta memoria. Las muestras, en estado líquido, se liofilizaron para poder ser analizadas en estado sólido. Los espectros FTIR se obtuvieron utilizando un espectrómetro Vertex 70 de Bruker Optics equipado con un DTGS y un accesorio *Golden Gate Diamond*. Los espectros se obtuvieron realizando 200 barridos en un rango de número de onda de entre $600\ \text{cm}^{-1}$ y $4000\ \text{cm}^{-1}$, con una resolución de $4\ \text{cm}^{-1}$. Finalmente, el análisis de datos se realizó utilizando el software OPUS proporcionado por el fabricante.

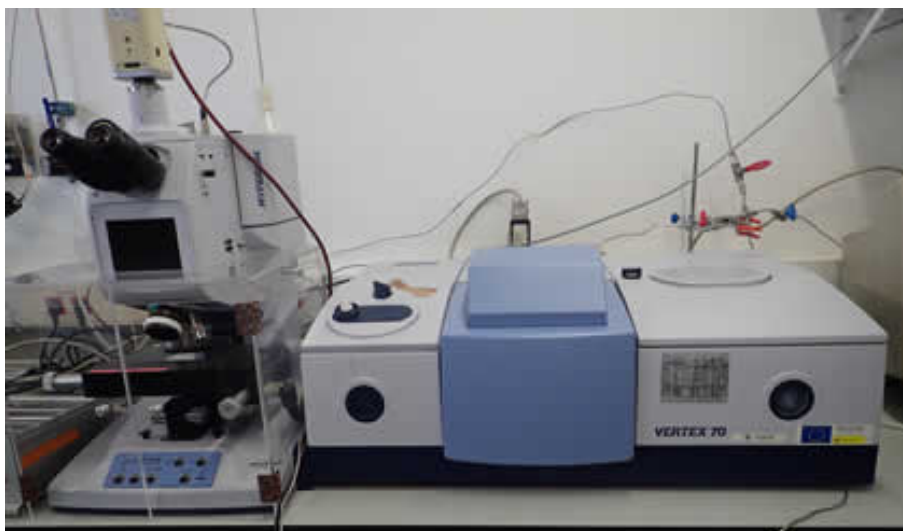


Figura A.3. Espectrómetro Vertex 70 de Bruker Optics equipado con un detector sulfato de triglicina deuterado (DTGS) y un accesorio Golden Gate Diamond. Obtenida de Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA) [6].

Espectrofotometría UV-Vis

Como se ha mencionado en la memoria, 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 esta 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 SPR. 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 [3].

El patrón de absorbancia UV-VIS de los nanomateriales (tanto NPs sin encapsular como exosomas cargados con las diferentes NPs) utilizados en este trabajo, se midió en el rango de 300 a 1100 nm. Los espectros UV-Vis se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro UV-VIS V-670 de Jasco. En todos los casos se tomó como línea base la absorbancia de dH₂O o de PBS, en función del solvente en el que estaba contenido la muestra.

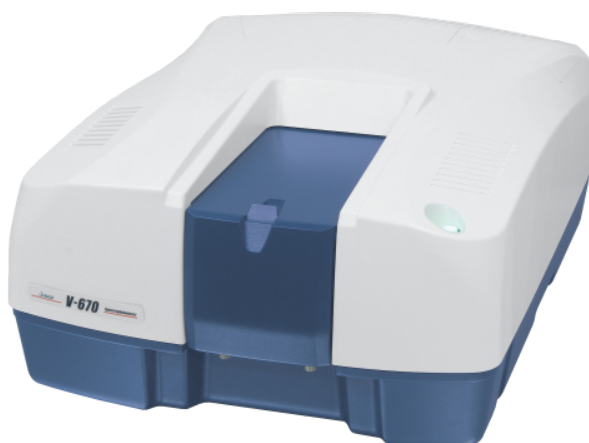


Figura A.4. Espectrofotómetro UV-VIS V-670 de Jasco. Obtenida de JASCO, Inc.[7]

TEM

En el análisis por TEM se irradia una muestra ultrafina con un haz de electrones para obtener imágenes de esta. Por su parte, los electrones difractados permiten obtener información relacionada con la estructura cristalina [3]. Se adquirieron micrografías de las NPs utilizando un T20-FEI Tecnai que cuenta con una fuente de electrones LaB6 unida a una lente con un objetivo “SuperTwin®” con una resolución de 2,4 Å operando a un voltaje máximo de 200 kDa (perteneciente al Laboratorio de Microscopías Avanzadas (LMA)).

Para preparar la muestra, una gota de la disolución las NPs se depositó sobre una rejilla de TEM. Esta rejilla, se colocó sobre un papel desecante favoreciendo la evaporación del disolvente. Las rejillas utilizadas fueron de cobre con recubrimiento de carbono/Formvar de 2 mm de diámetro. En el caso de querer observar la funcionalización de las partículas con los diferentes estabilizantes, así como evaluar su presencia en el interior de los exosomas, se utilizó PTA al 3 % como agente de contraste. El tamaño de partícula y la distribución del tamaño de cada muestra se obtuvieron mediante análisis de imagen usando ImageJ. Posteriormente, con el programa estadístico OriginPro®, se calcularon las frecuencias relativas y la distribución de tamaños.

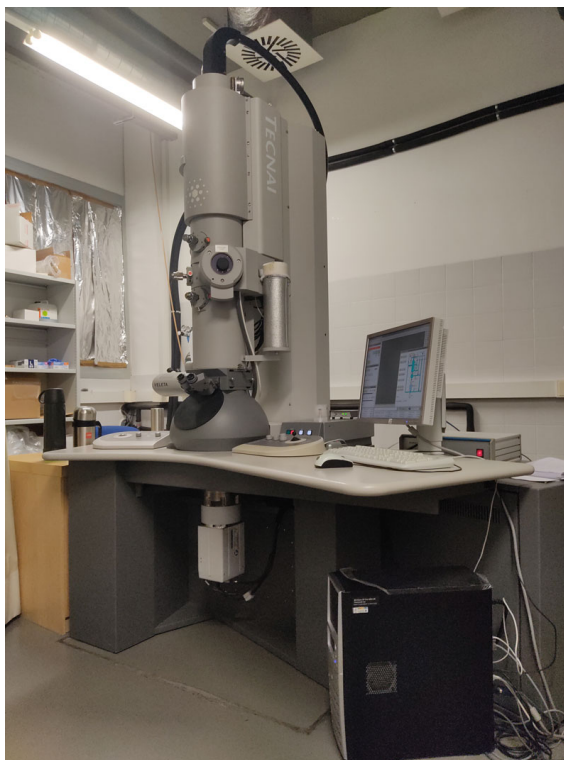


Figura A.5. Microscopio electrónico T20-FEI Tecnai. Obtenida de Laboratorio de Microscopías Avanzadas (LMA) [8]

Cuantificación de proteína total por BCA

El principio del kit de ensayo de proteínas Thermo Scientific™ Pierce™ BCA está basado en el uso de BCA para la detección y cuantificación colorimétrica de proteínas totales. Este método combina la conocida reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} por las proteínas en un medio alcalino (la reacción de Biuret) con la detección colorimétrica altamente sensible y selectiva del catión cuproso (Cu^{+1}) utilizando un reactivo único que contiene BCA. El producto de reacción de color púrpura de este ensayo se forma por la quelación de dos moléculas de BCA con un ion cuproso

que absorbe a 562 nm. La absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la disolución, la cual puede ser obtenida por comparación con una recta patrón de estándares de concentración conocida (0-2000 µg/mL) realizada con albúmina sérica (BSA) [9].

Los estándares y la muestra se añadieron en una placa de 96 pocillos, y se incubaron con la disolución 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.

NTA

Esta técnica proporciona la concentración y la distribución del tamaño de partículas en una disolución coloidal mediante el rastreo de NPs, similar al DLS descrito anteriormente. Las partículas se visualizan a través de un microscopio y durante la medida se realiza un video en el que se observa el movimiento browniano de las mismas. Posteriormente con un software de análisis de imagen se analiza la velocidad de movimiento de cada una de las partículas que está relacionada con el movimiento browniano y es función del tamaño de partícula. Con esta técnica es posible medir partículas con un tamaño entre 10 y 200 nm. La técnica requiere una cuidadosa preparación de la muestra y optimización de la concentración de partículas durante la medida. También proporciona información de la concentración de nanopartículas en la muestra. Se utilizó un equipo Nanosight NS500 (Malvern Panalytical) para evaluar el tamaño de los exosomas en presencia y en ausencia de NPs en PBS a pH=7 [10].

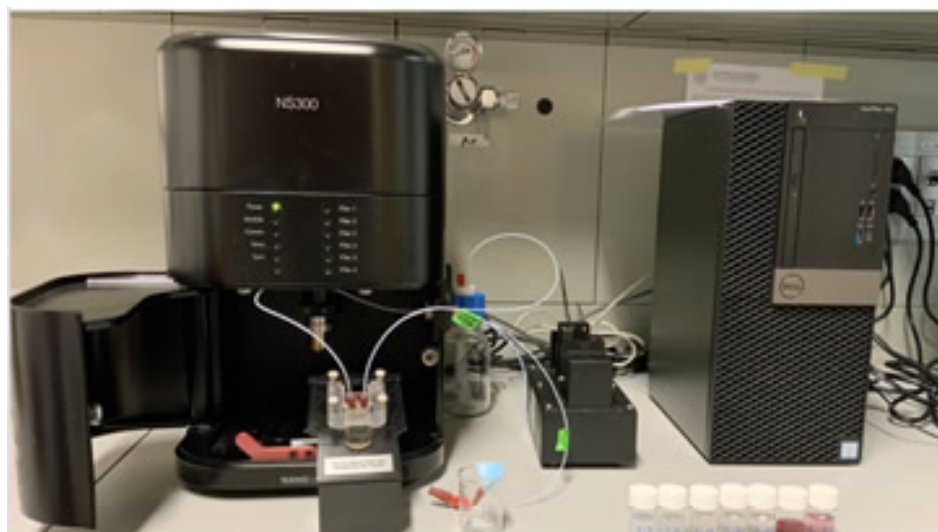


Figura A.6. Equipo Nanosight NS500. Obtenida de Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA) [10]

Análisis multiplex MACSPlex por citometría de flujo

El MACSPlex Exosome Kit permite la detección de 37 epítomos de superficie de vesículas extracelulares (EV), más dos controles de isotipo. El kit MACSPlex EV incluye un cóctel de varias poblaciones de microesferas marcadas con fluorescencia, cada una recubierta con un anticuerpo específico que se une a los respectivos epítomos de superficie. Las 39 poblaciones de microesferas se pueden distinguir por sus intensidades de fluorescencia detectadas por

citometría de flujo. En concreto, en este proyecto se utilizó un citómetro analizador Gallios (Beckman Coulter) del IACS localizado en la instalaciones CIBA.

Los exosomas se incuban con las microesferas de captura de exosomas MACSPlex recubiertas de anticuerpos. Posteriormente o en paralelo, los exosomas unidos a las cuentas de captura de exosomas MACSPlex están etiquetados con los reactivos de detección de exosomas MACSPlex. Los reactivos de detección también pueden combinarse para crear un cóctel que incluye el reactivo de detección de exosomas MACSPlex para CD9, CD63 y CD81. En consecuencia, se forman complejos sándwich entre la cuenta de captura del exosoma, el exosoma y el reactivo de detección. Estos complejos se pueden analizar en función de las características de fluorescencia tanto de la cuenta de captura del exosoma como del reactivo de detección. Las señales positivas indican la presencia del respectivo epítipo de la superficie dentro de la población de exosomas. También es posible comparar diferentes muestras de exosomas utilizando el kit que permite el análisis semicuantitativo de los epítipos de superficie diferencia [11].



Figura A.7. Citómetro analizador Gallios (Beckman Coulter). Obtenida de DOTmed [12]

Electroforesis SDS-PAGE

El análisis por electroforesis SDS-PAGE es ampliamente utilizado en bioquímica, genética, biología molecular y ciencia forense para separar las proteínas de acuerdo a su movilidad electroforética (en función de la longitud de la cadena peptídica, masa molecular, modificaciones postraduccionales y otros factores). Para realizar la separación de proteínas en primer lugar se sintetizó el gel de poliacrilamida con 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 [13].

Las **tablas A.1 y A.2** resumen los reactivos empleados en la síntesis de los geles concentrador y separador, respectivamente.

Tabla A.1. Disoluciones para preparar geles de resolución para electroforesis en gel de poliacrilamida
SDS tris-glicina al 12%.

Componentes de la disolución	Volúmenes de componentes (mL) por volumen de molde de gel							
	5 mL	10 mL	15 mL	20 mL	25 mL	30 mL	40 mL	50 mL
H ₂ O	1,6	3,3	4,9	6,6	8,2	9,9	13,2	16,5
30% acrilamida mix	1,2	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	16,0	20,0
1,5M Tris (pH 8,8)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
10% SDS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
10% persulfato de amonio	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02

Tabla A.2. Disoluciones para preparar geles stacking al 5% para electroforesis en gel de poliacrilamida
SDS tris-glicina.

Componentes de la disolución	Volúmenes de componentes (mL) por volumen de molde de gel							
	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL	6 mL	8 mL	10 mL
H ₂ O	0,68	1,4	2,1	2,7	3,4	4,1	5,5	6,8
30% acrilamida mix	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83	1,0	1,3	1,7
1,5M Tris (pH 6,8)	0,13	0,25	0,38	0,5	0,67	0,83	1,0	1,25
10% SDS	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
10% persulfato de amonio	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
TEMED	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,008	0,01

Para preparar las muestras, en primer lugar, se mezclaron 15 µL de la muestra con 5 µL del tampón de muestra 4X Laemmly™. Las muestras se calentaron durante 10 minutos a 95°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. Tras cargar las proteínas en el gel, 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. Finalmente, una vez separadas las proteínas, las correspondientes bandas fueron extraídas con ayuda de un bisturí para analizarlas por espectroscopía de masas.

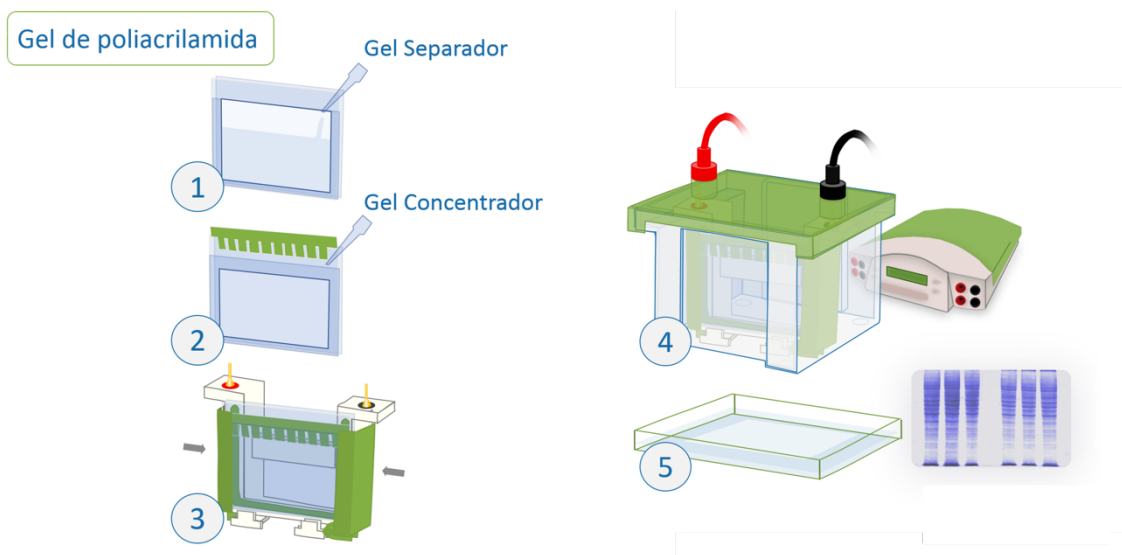


Figura A.8. Método de preparación de geles de poliacrilamida y tinción de Coomassie. 1. Se coloca la mezcla: Separado y se deja polimerizar. 2. Ya polimerizado se retira el iso-propanol y se coloca la mezcla concentrador. 3. Se abrocha el cassette en los electrodos y se coloca el buffer de corrida. 4. Se coloca la tapa, se conecta y se programa a la fuente de poder. 5. Se retira el gel y se tiñe con Coomassie toda la noche. Al retirar del Coomassie se lava para quitar el exceso y se escanea con un densitómetro.

Obtenida de Conogasi [14]

Espectrometría de masas

Se trata de una técnica que lleva a cabo una cuantificación relativa de proteínas sin marcaje por espectrometría de masas de alta resolución. En esta metodología, las proteínas de las muestras se digieren con la enzima tripsina y los péptidos resultantes se analizan por cromatografía líquida acoplada al espectrómetro de masas de alta resolución. La identificación de las proteínas se realiza mediante los espectros de MS/MS y su cuantificación relativa se realiza según la intensidad de los péptidos en el espectro de MS. Variaciones en dichas intensidades se traducen en una variación en los niveles de la proteína que dio lugar a dicho péptido [15].

Una vez recortadas las bandas de los geles de electroforesis estas fueron llevadas al SCT de Proteómica del CIBA y fueron procesadas por los técnicos de laboratorio utilizando técnicas de espectrometría de masas y cromatografía líquida. En concreto, Se empleó un espectrómetro de masas de alta resolución y movilidad iónica TIMS TOF Flex (Bruker Daltonics), acoplado en línea a un cromatógrafo líquido EvoSep ONE (EvoSep). Finalmente, se llevó a cabo la identificación de las proteínas presentes en las diferentes muestras con la plataforma PaSER y se buscaron en la base de datos de proteínas Uniprot. Los resultados de la identificación de proteínas se entregaron en formato Excel se ordenaron de mayor a menor abundancia según el parámetro empAI.

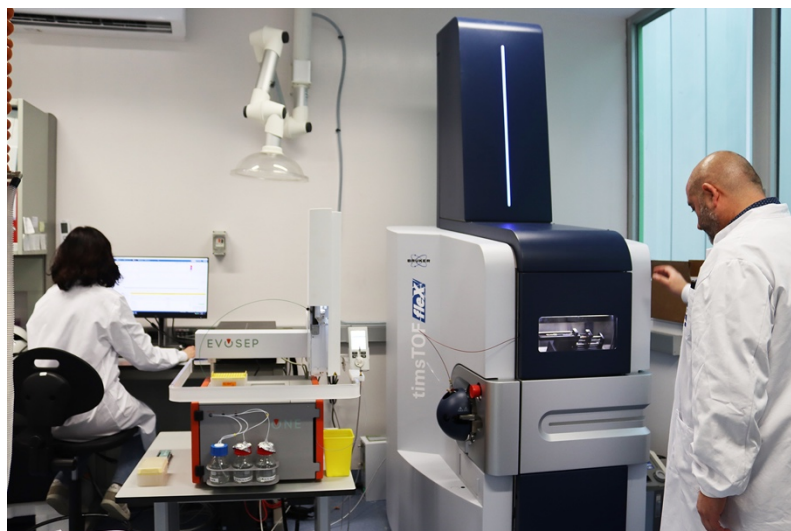


Figura A.9. Espectrómetro de masas de alta resolución y movilidad iónica TIMS TOF FLEX (Bruker), cromatógrafo Evosep One (Evosep). Obtenida de Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS) [15].

ANEXO 2. GRÁFICAS DE LOS ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES

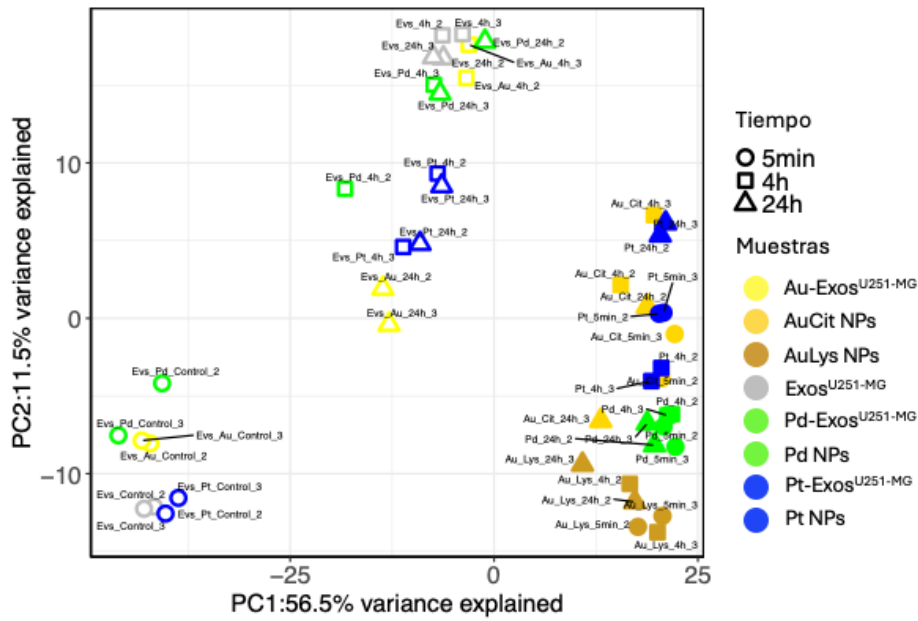


Figura A.10. PCAs de todas las muestras estudiadas en este trabajo. Los símbolos huecos corresponden con muestras de exosomas y los sólidos a las NPs sin encapsular. El color indica el material de la partícula y la forma el tiempo.

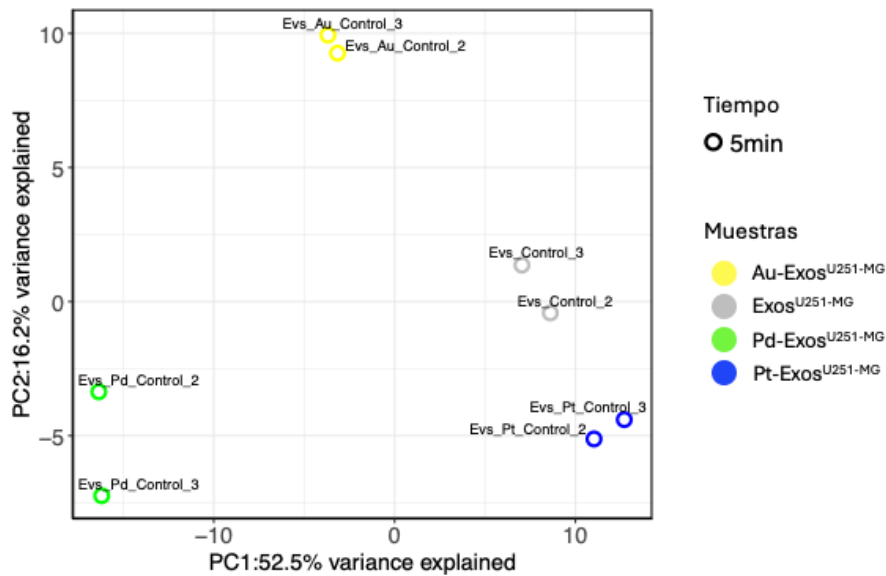


Figura A.11. PCAs de las muestras del primer clúster que recogen los Exos^{U251-MG} a los 5 minutos. El color indica el material de la partícula.

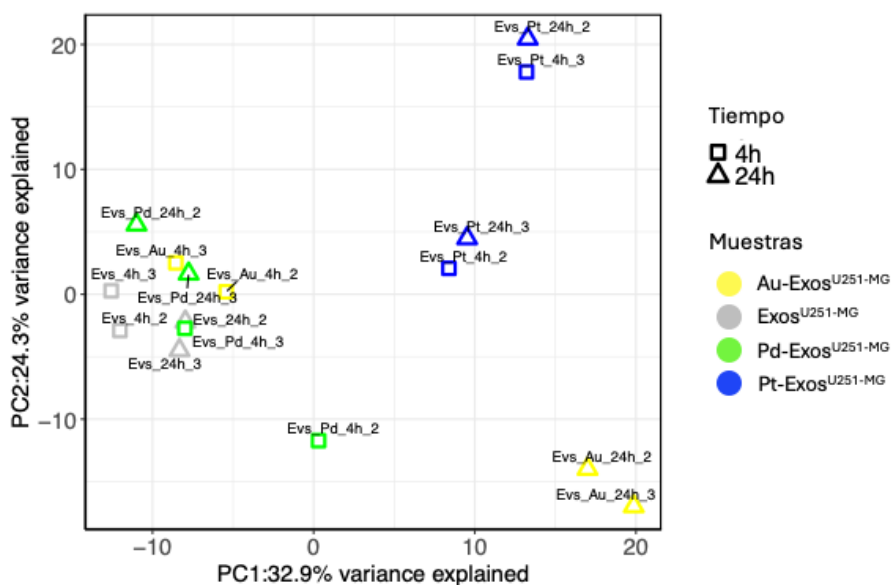


Figura A.12. PCAs de las muestras del segundo clúster en el que se representan las muestras de los Exos^{U251-MG} a las 4h y 24h. El color indica el material de la partícula y la forma el tiempo.

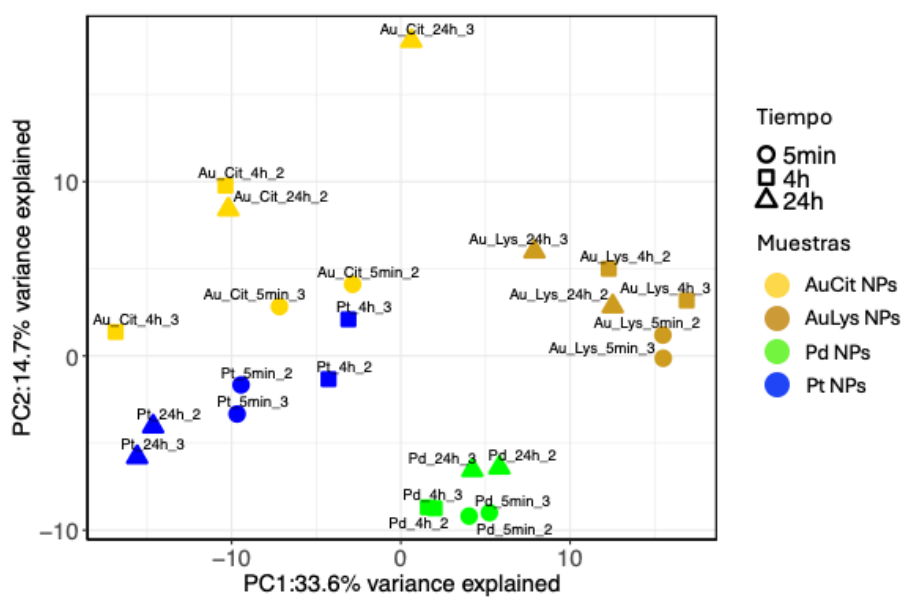


Figura A.13. PCAs de las muestras del tercer clúster que engloba las NPs sin encapsular a todos los tiempos. El color indica el material de la partícula y la forma el tiempo.

ANEXO 3. DIAGRAMAS DE VENN

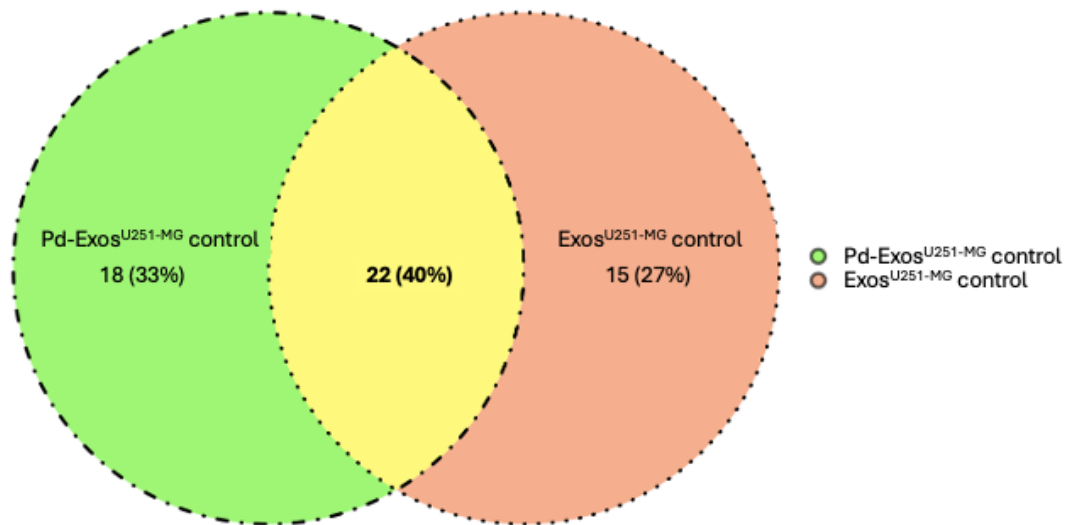


Figura A14. Diagrama de Venn que muestra las proteínas comunes entre los Pd-Exos^{U251-MG} y los Exos^{U251-MG} a tiempo 0 (sin incubar con medio de cultivo).

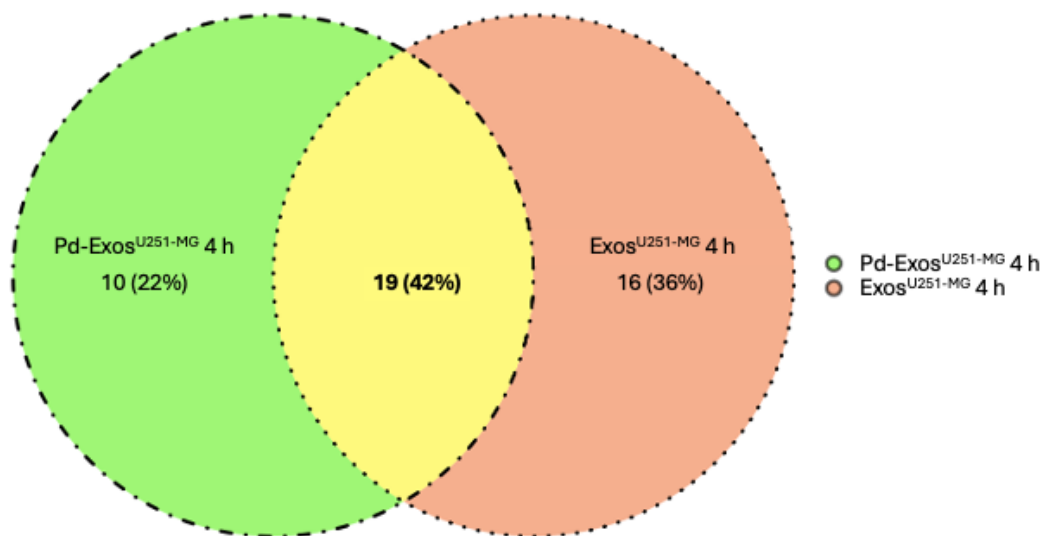


Figura A15. Diagrama de Venn que muestra las proteínas comunes entre los Pd-Exos^{U251-MG} y los Exos^{U251-MG} a las 4 horas.

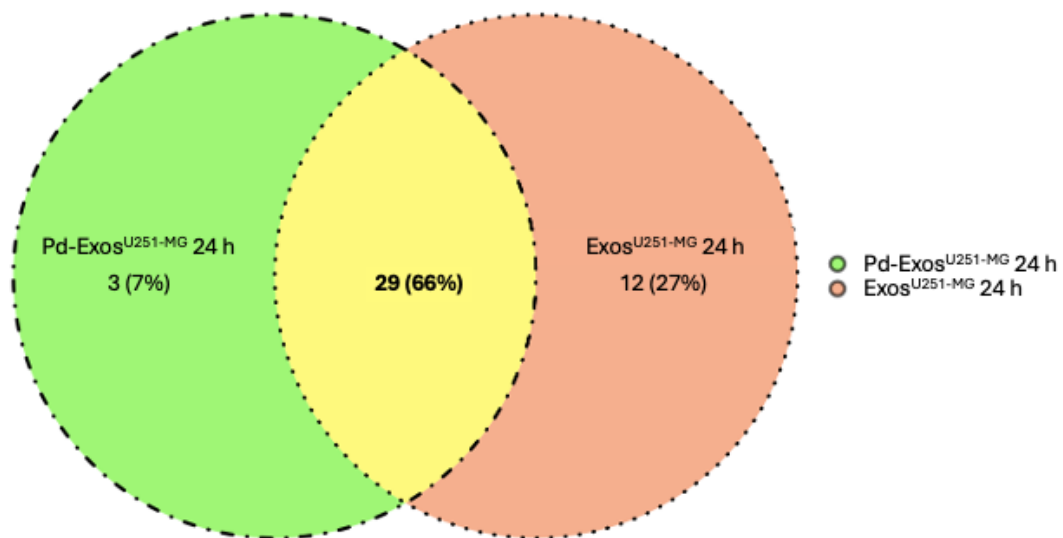


Figura A16. Diagrama de Venn que muestra las proteínas comunes entre los Pd-Exos^{U251-MG} y los Exos^{U251-MG} a las 24 horas.

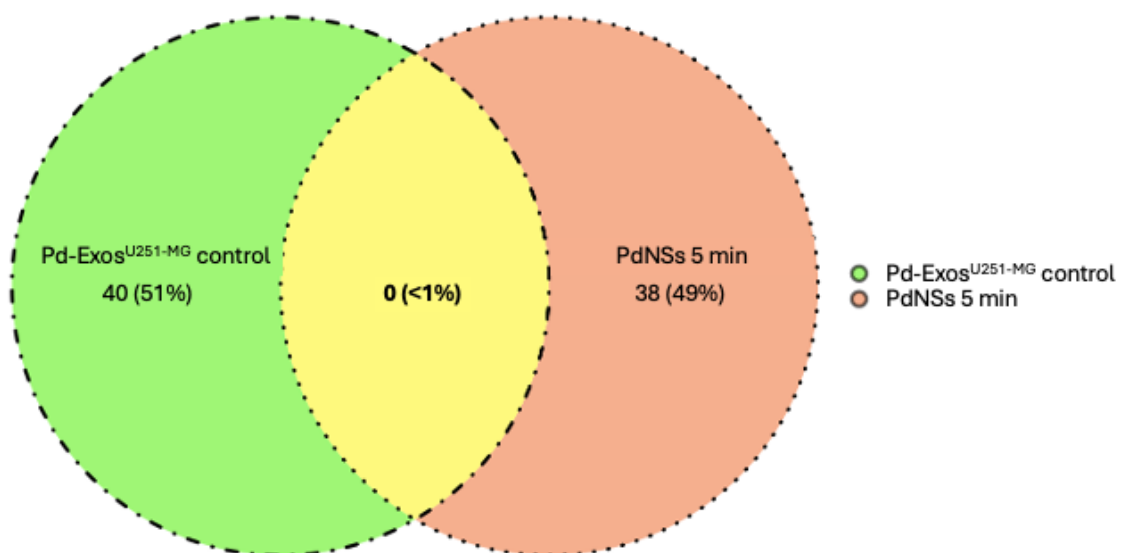


Figura A17. Diagrama de Venn que muestra las proteínas comunes entre los Pd-Exos^{U251-MG} y las PdNSs a tiempo 0 (sin incubar con medio de cultivo).

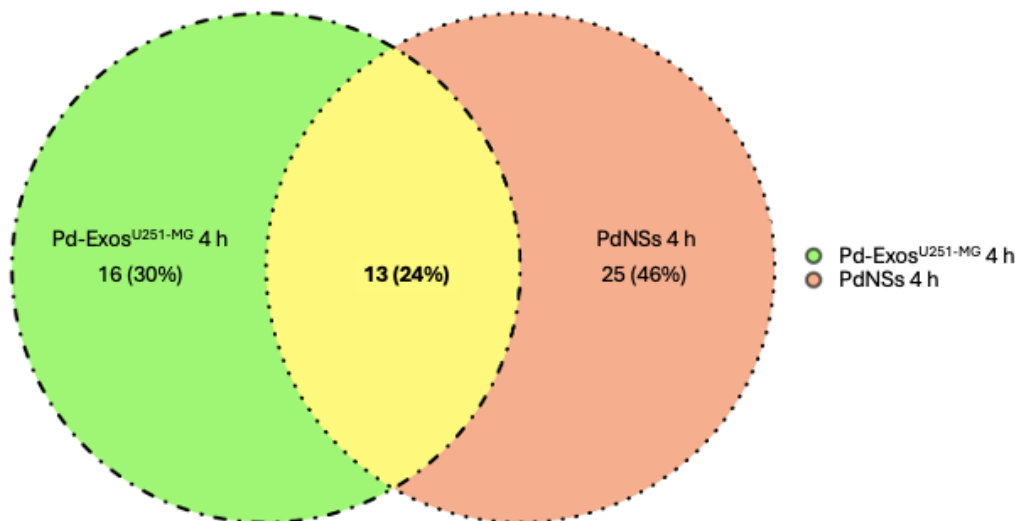


Figura A18. Diagrama de Venn que muestra las proteínas comunes entre los Pd-Exos^{U251-MG} y las PdNSs a las 4 horas.

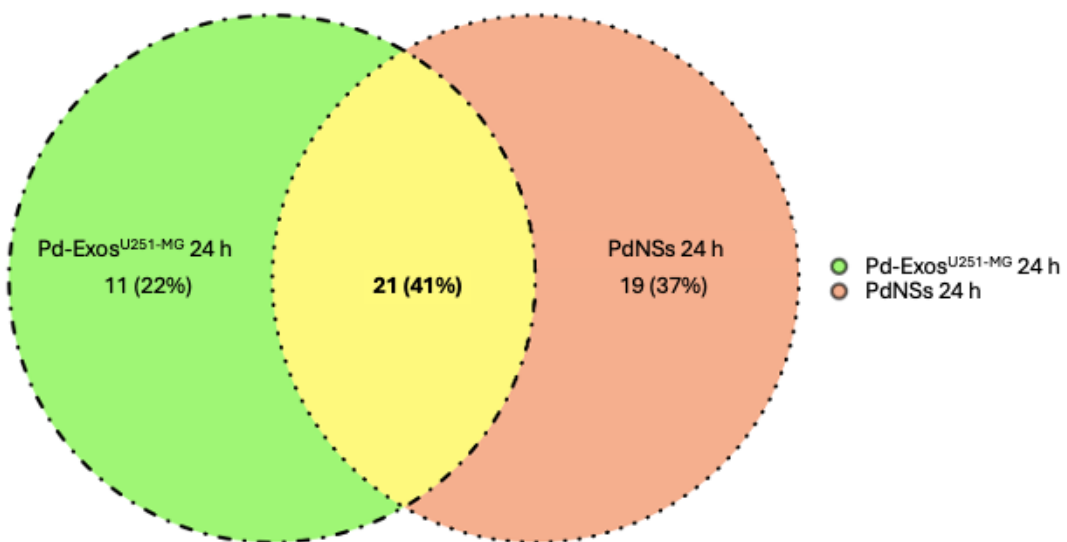


Figura A19. Diagrama de Venn que muestra las proteínas comunes entre los Pd-Exos^{U251-MG} y las PdNSs a las 24 horas.

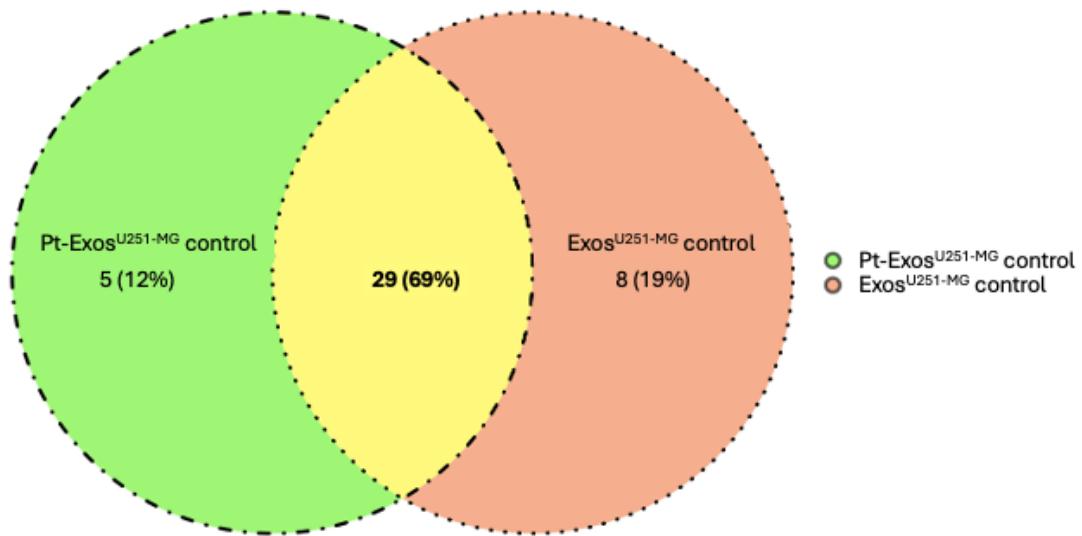


Figura A20. Diagrama de Venn que muestra las proteínas comunes entre los Pt-Exos^{U251-MG} y los Exos^{U251-MG} a tiempo 0 (sin incubar con medio de cultivo).

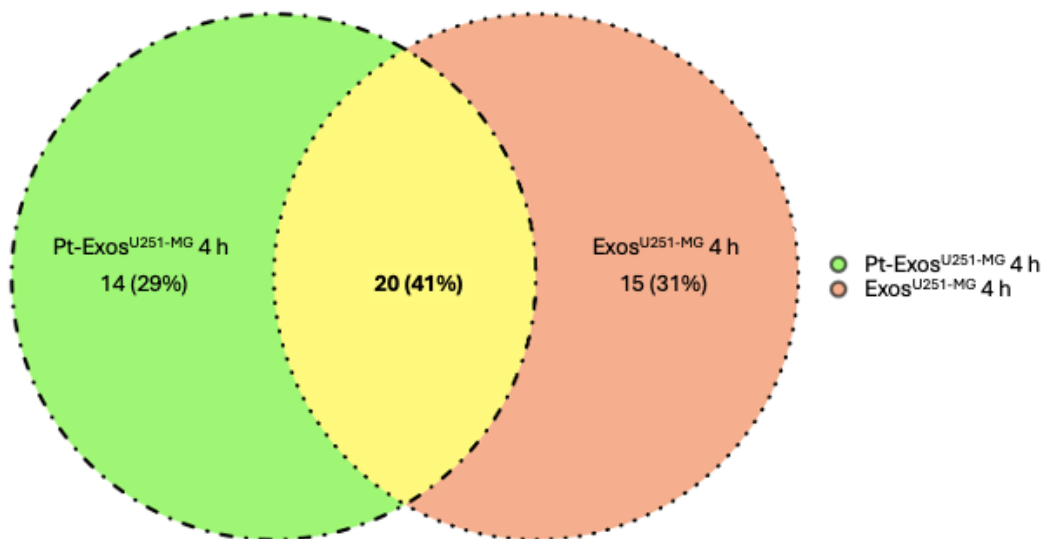


Figura A21. Diagrama de Venn que muestra las proteínas comunes entre los Pt-Exos^{U251-MG} y los Exos^{U251-MG} a las 4 horas.

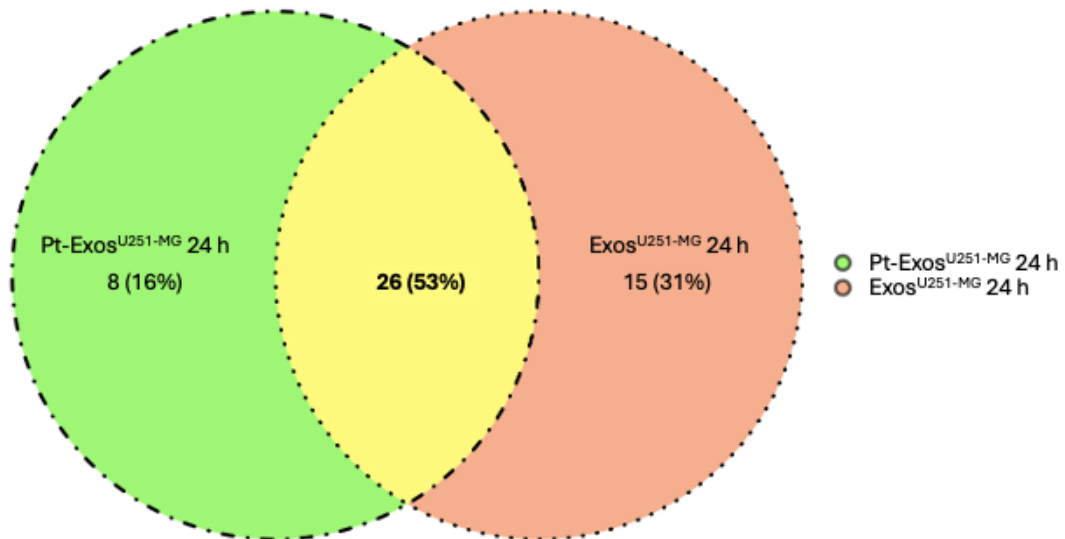


Figura A22. Diagrama de Venn que muestra las proteínas comunes entre los Pt-Exos^{U251-MG} y los Exos^{U251-MG} a las 24 horas.

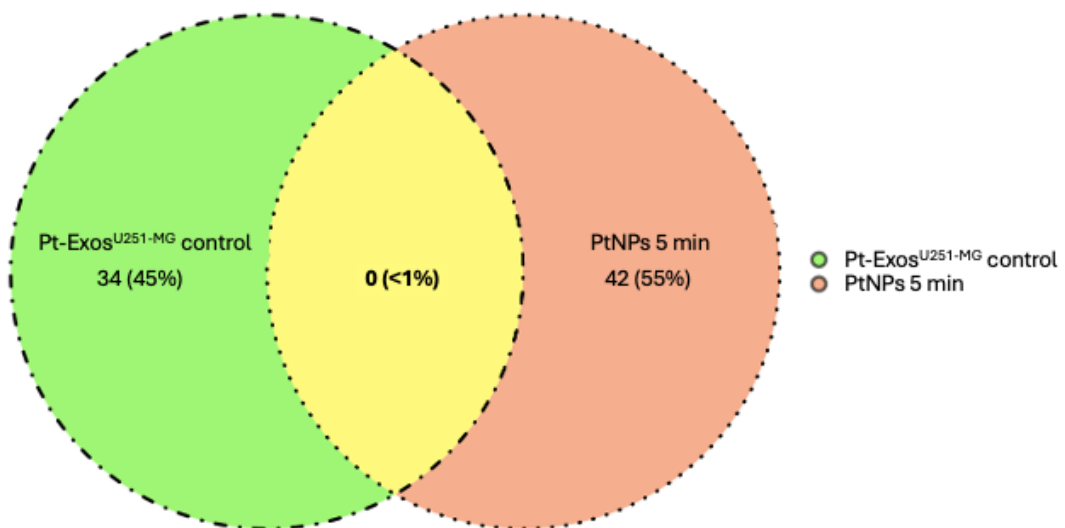


Figura A23. Diagrama de Venn que muestra las proteínas comunes entre los Pt-Exos^{U251-MG} y las PtNPs a tiempo 0 (sin incubar con medio de cultivo).

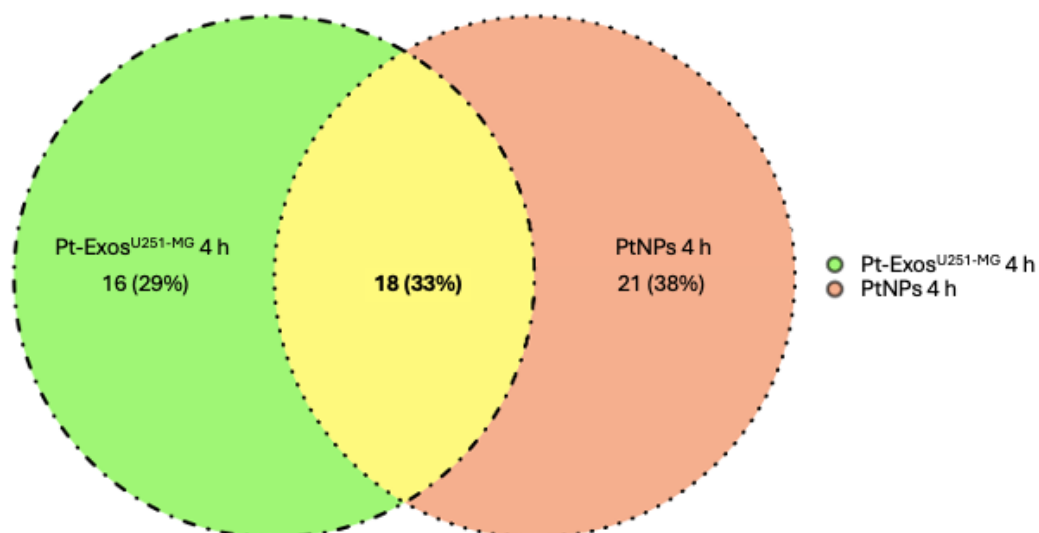


Figura A24. Diagrama de Venn que muestra las proteínas comunes entre los Pt-Exos^{U251-MG} y las PtNPs a las 4 horas.

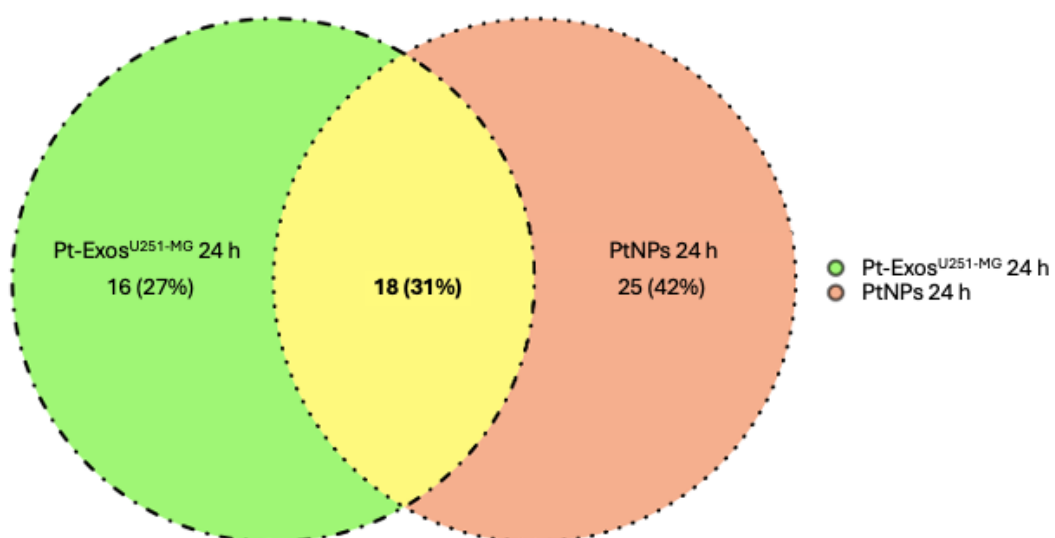


Figura A25. Diagrama de Venn que muestra las proteínas comunes entre los Pt-Exos^{U251-MG} y las PtNPs a las 24 horas.

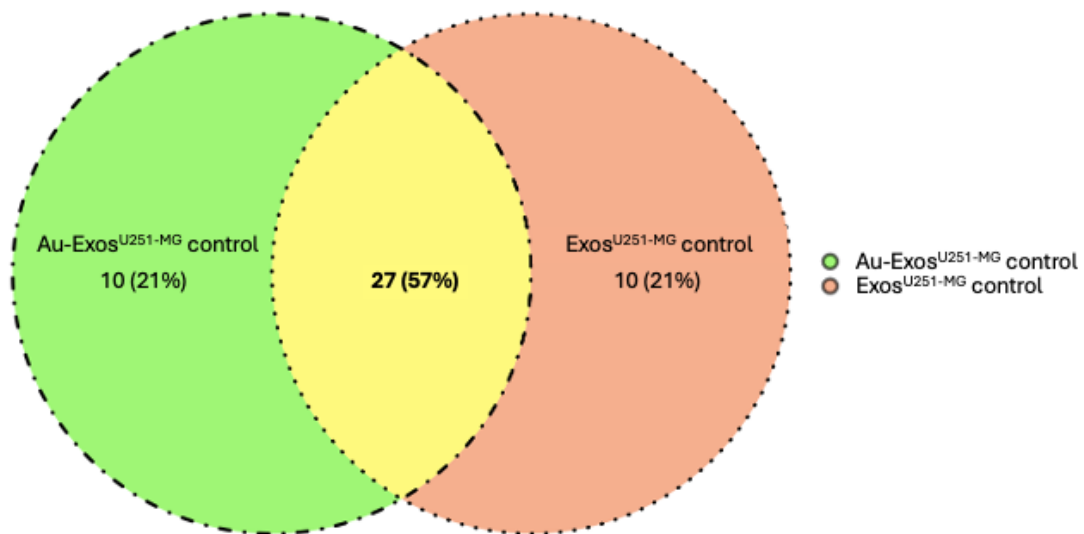


Figura A26. Diagrama de Venn que muestra las proteínas comunes entre los Au-Exos^{U251-MG} y los Exos^{U251-MG} a tiempo 0 (sin incubar con medio de cultivo).

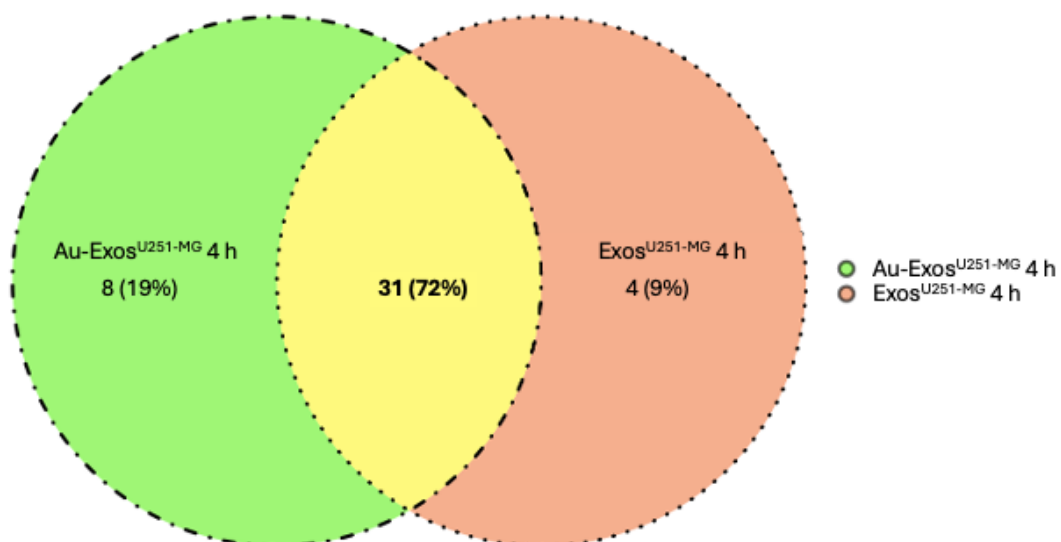


Figura A27. Diagrama de Venn que muestra las proteínas comunes entre los Au-Exos^{U251-MG} y los Exos^{U251-MG} a las 4 horas.

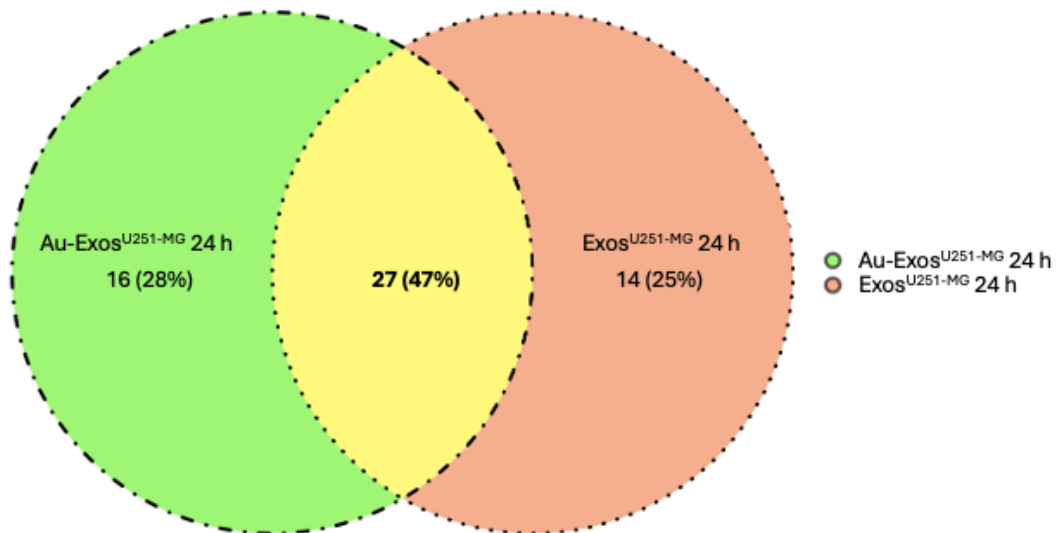


Figura A28. Diagrama de Venn que muestra las proteínas comunes entre los Au-Exos^{U251-MG} y los Exos^{U251-MG} a las 24 horas.

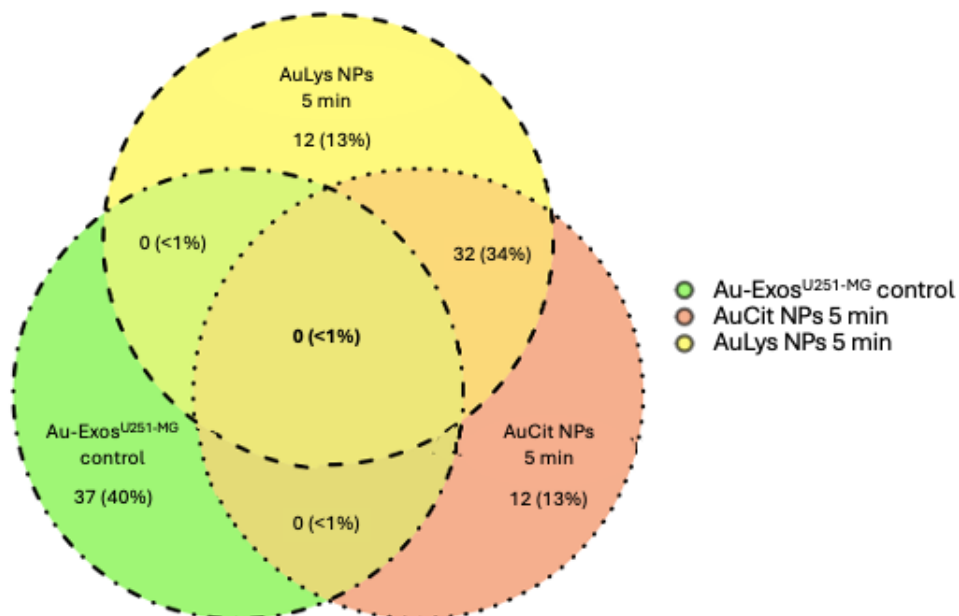


Figura A29. Diagrama de Venn que muestra las proteínas comunes entre los Au-Exos^{U251-MG} y las AuNPs (AuCit NPs y AuLys NPs) a tiempo 0 (sin incubar con medio de cultivo).

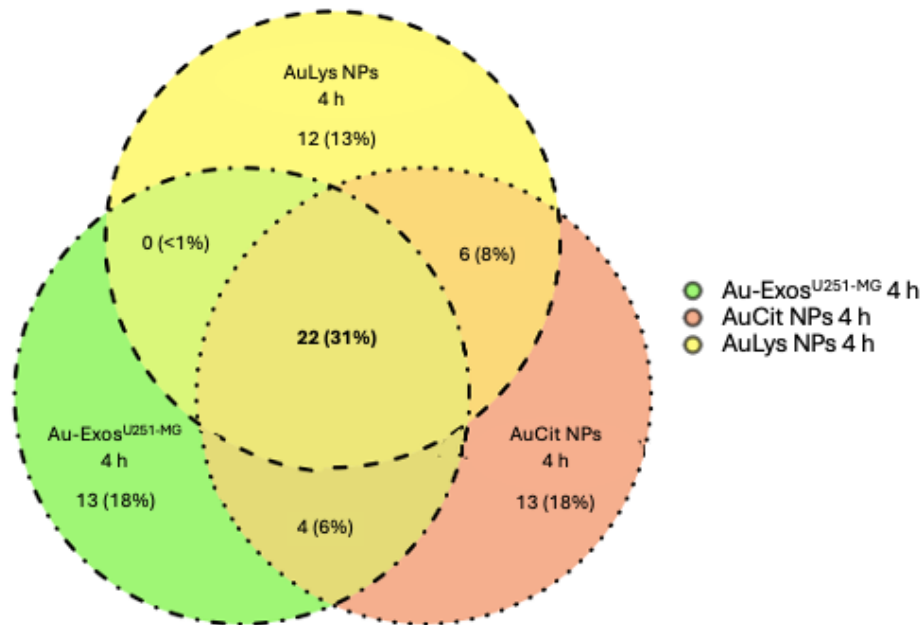


Figura A30. Diagrama de Venn que muestra las proteínas entre los Au-Exos^{U251-MG} y las AuNPs (AuCit NPs y AuLys NPs) a las 4 horas.

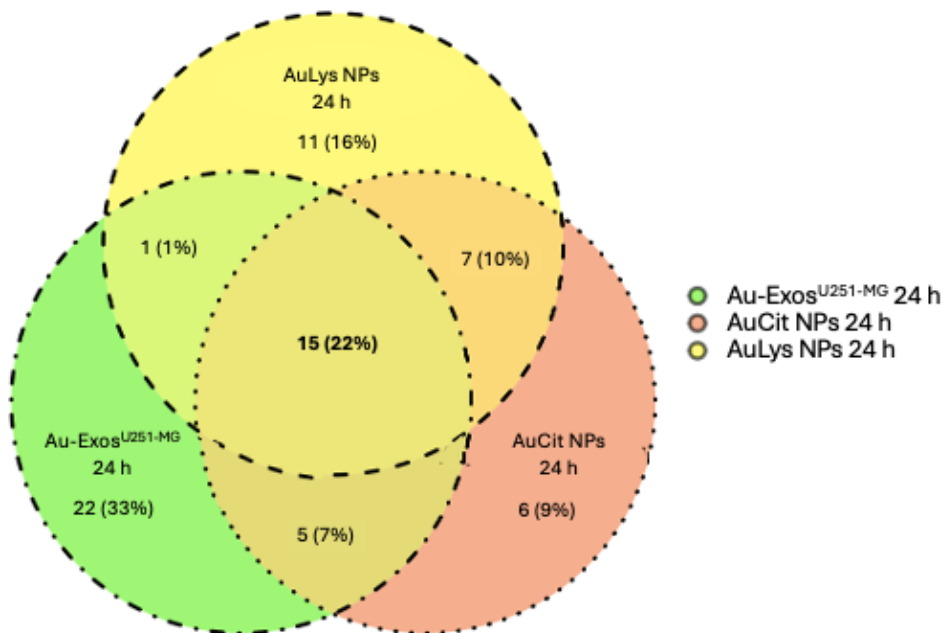


Figura A31. Diagrama de Venn que muestra las proteínas comunes entre los Au-Exos^{U251-MG} y las AuNPs (AuCit NPs y AuLys NPs) a las 24 horas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Microtrac, “Dispersión de luz dinámica.” Acceso: Sep. 11, 2024. [Online]. Disponible: <https://www.microtrac.es/es/productos/dispersion-de-luz-dinamica/>
- [2] Laboratorio de Técnicas Instrumentales, “Dispersión de luz dinámica (DLS).” Acceso: Sep. 11, 2024. [Online]. Disponible: <https://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/dispersin-de-luz-dinamica-dls>
- [3] M. Sancho Albero, S. Ramiro, J. Martín Duque, and M. del Pilar, Tesis Doctoral “Vehículos híbridos formados por exosomas y nanopartículas. Aplicaciones en terapia y diagnóstico del cáncer. / María Sancho Albero,” 2020. [Online]. Disponible: <http://zagan.unizar.es>
- [4] Artisan Technology Group, “Brookhaven 90Plus particle size analyze.” Acceso: Sep. 11, 2024. [Online]. Disponible: <https://www.artisan-tg.com/Scientific/58223-6/Brookhaven-90Plus-Particle-Size-Analyzer>
- [5] Agilent Technologies Life Sciences and Chemical, “Analizador de tamaño de partículas / de forma / de dispersión de luz dinámica / compacto.” Acceso: Sep. 11, 2024. [Online]. Disponible: <https://www.directindustry.es/prod/agilent-technologies-life-sciences-and-chemical/product-32598-2007928.html>
- [6] Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA), “Caracterización espectroscópica.” Acceso: Sep. 11, 2024. [Online]. Disponible: <https://inma.unizar-csic.es/investigacion/infraestructura-cientifica-del-inma/caracterizacion-de-materiales/caracterizacion-espectroscopica/>
- [7] Inc. JASCO, “Haze measurement with a UV-Visible spectrophotometer.” Acceso: Sep. 11, 2024. [Online]. Disponible: <https://jascoinc.com/applications/haze-measurement-uv-visible-spectrophotometer/>
- [8] Laboratorio de Microscopías Avanzadas (LMA), “Tecnai T20.” Acceso: Sep. 11, 2024. [Online]. Disponible: <https://lma.unizar.es/tecnai-t20/>
- [9] Thermo Fisher Scientific, *Pierce BCA Protein Assay Kit*.
- [10] Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA), “Otras propiedades y técnicas.” Acceso: Sep. 11, 2024. [Online]. Disponible: <https://inma.unizar-csic.es/investigacion/infraestructura-cientifica-del-inma/caracterizacion-de-materiales/otras-propiedades-y-tecnicas/>
- [11] Miltenyi Biotec, “MACSPlex Exosome Kits (Kit de detección y caracterización de exosomas) ”.
- [12] DOTmed, “Beckman Coulter Navios flow cytometer.” Acceso: Sep. 11, 2024. [Online]. Disponible: <https://es.dotmed.com/listing/flow-cytometer/beckman-coulter/navios/2636736>
- [13] Sigma-Aldrich, “Preparación manual de los geles para PAGE y SDS-PAGE utilizando los kits de moldeo de gel Bis-Tris TurboMix mPAGE®.” Acceso: Sep. 11, 2024. [Online]. Disponible: <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/technical-documents/protocol/protein-biology/gel-electrophoresis/handcasting-gels-turbomix>

- [14] Conogasi, "Método de gel de poliacrilamida para proteínas." Acceso: Sep. 11, 2024. [Online]. Disponible: <https://conogasi.org/articulos/metodo-gel-de-poliacrilamida-para-proteinas/>
- [15] Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS), "Proteómica." Acceso: Sep. 11, 2024. [Online]. Disponible: <https://www.iacs.es/servicios/servicios-cientifico-tecnicos/proteomica/>