



Facultad de Medicina
Universidad Zaragoza



Universidad
Zaragoza

INMA
INSTITUTO DE NANOCIENCIA
Y MATERIALES DE ARAGÓN

Trabajo Fin de Máster

Liofilización de Vesículas Extracelulares para el direccionamiento de nanopartículas terapéuticas contra células tumorales diana.

Freeze-drying of extracellular vesicles for targeting therapeutic nanoparticles against tumour cells.

Autor/es

Leyre Abón Olivera

Director/es

María Sancho Albero

Jesús Santamaría Ramiro

Ponente/es

Jesús Santamaría Ramiro

Facultad de Medicina

Máster en Inmunología Tumoral e Inmunoterapia del Cáncer.

Curso 2024/2025

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis tutores de TFM, María Sancho y Jesús Santamaría, por su constante apoyo, orientación y generosidad al compartir sus conocimientos. Su implicación ha sido fundamental para la realización de este trabajo y para mi desarrollo personal y profesional a lo largo del proyecto.

También agradezco al grupo de investigación NFP por acogerme desde el primer día y hacerme sentir parte del equipo, permitiéndome crecer en un entorno tan enriquecedor. En especial, gracias a Nuria Navascués por su ayuda en los análisis moleculares, y a Víctor Sebastián y José Luis Hueso por su colaboración y guía en los estudios de microscopía. Agradezco igualmente la disponibilidad y ayuda de Javier Godino del SCT de Separación Celular y Citometría del IACS.

Por último, gracias a mi familia, por su apoyo incondicional y por motivarme siempre a seguir mi camino con entusiasmo. A mis amigas, y a todas aquellas personas que han estado a mi lado durante este proceso, gracias por vuestra compañía, ánimo y confianza, que han sido clave para llegar hasta aquí.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

GLOSARIO DE ABREVIATURAS	
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 CONTEXTO DEL CÁNCER	2
1.2 MUTACIONES SOMÁTICAS Y RESISTENCIA TUMORAL	3
1.3 APLICACIÓN DE LA NANOMEDICINA EN ONCOLOGÍA.....	4
1.4 EVs COMO VECTORES TERAPÉUTICOS	5
1.5 LIOFILIZACIÓN DE EVs.....	8
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1 LÍNEAS CELULARES	10
3.1.1 MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS CELULARES	10
3.1.2 CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE LAS CÉLULAS	11
3.2 AISLAMIENTO DE EVs ^{B16-F10} POR ULTRACENTRIFUGACIÓN.....	11
3.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS EVs ^{B16-F10}	12
3.3.1 CUANTIFICACION DE PROTEÍNA TOTAL POR BCA	13
3.3.2 TEM	13
3.3.3. Potencial zeta	13
3.3.4 NTA	14
3.3.5 ANÁLISIS multiplex MACSPlex EV POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	14
3.4 SÍNTESIS Y ENCAPSULACIÓN DE NPs EN EVs ^{B16-F10}	14
3.4.1 SÍNTESIS Y ENCAPSULACIÓN de PEG-HGNPs: Generación de HG-EVs ^{B16-F10}	15
3.4.1.1 CARACTERIZACIÓN POR UV-VIS.....	16
3.4.1.2 ANÁLISIS CITOTOXICIDAD METABÓLICA	16
3.4.2 SÍNTESIS Y ENCAPSULACIÓN DE LAS PtNPs: Generación de Pt-EVs ^{B16-F10}	18
3.4.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS NPs-EVs ^{B16-F10} (HG-EVs ^{B16-F10} y Pt-EVs ^{B16-F10})	19
3.5 LIOFILIZACIÓN DE LAS EVs ^{B16-F10}	20
3.5.1 LIOFILIZACIÓN Y CARACTERIZACION DE EVs	20
3.6 DETERMINACION DE LA ESTABILIDAD DE LAS EVs ^{B16-F10} LIOFILIZADAS.....	22
3.7 EVALUACION DE LA INTERNALIZACION Y LA SELECTIVIDAD DE LAS EVs ^{B16-F10} LIOFILIZADAS.....	22

3.7.1. DETERMINACION DE LA INTERNALIZACION CELULAR	22
3.7.1.1 MICROSCOPIA CONFOCAL.....	23
3.7.2. ANALISIS DE LA SELECTIVIDAD CELULAR.....	24
3.7.2.1 MICROSCOPIA CONFOCAL.....	24
3.7.2.2 ICP-MS.....	24
3.8 EVALUACIÓN DE LA EFICACIA TERAPÉUTICA DE NPs- EVs ^{B16-F10} LIOFILIZADAS	25
3.8.1 ENSAYO DE TERAPIA FOTODINÁMICA (FOTOTERAPIA).....	26
3.8.2 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD DE LAS PtNPs	27
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1 CARACTERIZACIÓN DE EVs ^{B16-F10} VACIAS PRE- Y POST-LIOFILZACIÓN	28
4.1.1 CARACTERIZACIÓN DE EVs ^{B16-F10} VACIAS SIN LIOFILIZAR	28
4.1.2 CARACTERIZACIÓN DE EVs ^{B16-F10} VACIAS LIOFILIZADAS	30
4.2 ENSAYOS EVs ^{B16-F10} VACIAS LIOFILIZADAS.....	35
4.2.1 ENSAYO ESTABILIDAD	35
4.2.2 ENSAYO INTERNALIZACIÓN.....	38
4.2.3 ENSAYO DE SELECTIVIDAD	39
4.3 CARATERIZACIÓN DE NPs SINTETIZADAS Y NPs-EVs ^{B16-F10} LIOFILIZADAS.....	42
4.3.1 CARACTERIZACIÓN DE HGNPs SINTETIZADAS.....	42
4.3.2 CARACTERIZACIÓN DE PtNPs SINTETIZADAS y de las Pt-EVs ^{B16-F10}	44
4.3.3 CARACTERIZACIÓN DE NPs-EVs ^{B16-F10} LIOFILIZADAS	45
4.4 INTERNALIZACION DE LAS NPs- EVs ^{B16-F10} LIOFILIZADAS.....	49
4.4.1 ANÁLISIS POR ICP-MS	49
4.4.2 ENSAYO DE LAS HG-EVs ^{B16-F10} MEDIANTE FOTOTERAPIA	51
4.4.3 ENSAYO Pt-EVs ^{B16-F10} MEDIANTE CITOTOXICIDAD	53
5. CONCLUSIONES.....	54
CONCLUSIONS	56
6. BIBLIOGRAFÍA	58
ANEXOS	62
ANEXO 1. TÉCNICAS EMPLEADAS: FUNDAMENTO, EQUIPO Y USO	62

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AR	Agua Regia
ARN	Ácido ribonucleico
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina Sérica
CIBA	Centro de Investigación Biomédica de Aragón
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
DLS	Dispersión dinámica de la Luz
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EVs	Vesículas Extracelulares
EVs^{B16-F10}	Vesículas Extracelulares derivadas de células B16-F10
FBS	Suero fetal bovino
FTIR	Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier
HGNPs	Nanopartículas de Oro Huecas
HG- EVs^{B16-F10}	Vesículas Extracelulares derivadas de células B16-F10 cargadas con HGNPs
IACS	Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud
ICP-MS	Espectroscopia de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente
INMA	Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón
INSST	Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo
ISEV	Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares
LMA	Laboratorio de Microscopías Avanzadas
mARN	ARN mensajero
MVB	Cuerpo Multivesicular
NIR	Espectro de Infrarrojo cercano
NFP	Partículas y Películas Nanoestructuradas
NPs	Nanopartículas
NTA	Análisis de rastreo de nanopartículas
OMS	Organización Mundial de la Salud
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
PEG	Polietilenglicol
PEG-HGNPs	Nanopartículas de Oro Huecas PEGiladas
Pt- EVs^{B16-F10}	Vesículas Extracelulares derivadas de células B16-F10 cargadas con PtNPs
PtNPs	Nanopartículas de Platino
PVP	Polivinilpirrolidona
SEOM	Sociedad Española de Oncología Médica

siARN	ARN de silenciamiento
SPR	Resonancia de Plasmón Superficial
TEM	Microscopía electrónica de Transmisión
TITAN	Microscopía electrónica de campo oscuro de Alta resolución
UV-VIS	Ultravioleta visible
VLA-EC	Valor Límite Ambiental de Exposición de Corta duración

RESUMEN

El presente Trabajo de Fin de Máster, titulado “Liofilización de Vesículas extracelulares para el direccionamiento de nanopartículas terapéuticas contra células tumorales diana”, ha sido desarrollado en el grupo de Investigación de Partículas y Películas Nanoestructuradas (NFP), perteneciente al Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA) de la Universidad de Zaragoza y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Las vesículas extracelulares (EVs), y en particular los exosomas, son estructuras de pequeño tamaño, entorno a los 100 nm de diámetro, y de origen endosómico que participan activamente en la comunicación intercelular, lo que las convierte en candidatas idóneas como vehículos de administración dirigida de fármacos o nanopartículas (NPs) hacia células diana.

Este estudio se centra en el desarrollo de un método de liofilización para la generación y conservación de EVs cargadas con NPs metálicas terapéuticas como herramienta antitumoral, analizando su impacto en la estabilidad, capacidad de internalización y especificidad celular. En definitiva, esta investigación contribuye al avance del conocimiento en el uso combinado de nanotecnología y terapias avanzadas, con el objetivo de optimizar sistemas de entrega terapéutica selectivos, eficientes y personalizados frente al cáncer.

ABSTRACT

This Master's Thesis, entitled 'Lyophilisation of extracellular vesicles for the targeting of therapeutic nanoparticles against tumour cells', has been developed in the Nanostructured Particles and Films (NFP) research group, belonging to the Institute of Nanoscience and Materials of Aragon (INMA) of the University of Zaragoza and the Spanish National Research Council (CSIC).

Extracellular vesicles (EVs), and in particular exosomes, are small structures, around 100 nm of diameter and of endosomal origin that actively participate in intercellular communication, which makes them promising candidates as vehicles for targeted delivery of drugs or nanoparticles (NPs) to target cells.

This study focuses on the developments of a freeze-drying method to create and preserve EVs loaded with therapeutic metallic NPs as antitumoral tools, analysing their impact on stability, internalisation capacity and cell specificity. To sum up, this research contributes to the advancement of knowledge combining the last advances of nanotechnology with advanced therapies, in order to optimize more selective, efficient and personalised therapeutic delivery systems against cancer.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CONTEXTO DEL CÁNCER

El cáncer es actualmente una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel global. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2019 fue una de las principales causas de muerte prematura, antes de los 70 años, en 112 de los 183 países analizados [1]. Estas cifras globales siguen aumentando: en el año 2020 se registraron 18,1 millones de nuevos diagnósticos de cáncer, excluyendo los tumores cutáneos no melanoma, y se produjeron aproximadamente 10 millones de muertes relacionadas con esta enfermedad [1].

Además, las expectaciones futuras son preocupantes. Se estima que en el año 2040 el número de casos nuevos anuales alcance los 29,5 millones, debido al crecimiento poblacional, al envejecimiento de la población y al aumento en la exposición a factores de riesgo como el tabaquismo, el consumo de alcohol, la obesidad, la dieta inadecuada y el sedentarismo. A nivel nacional, la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) estima que en 2025 se producirán 296.103 nuevos diagnósticos, un 3,3% más que en 2024, y que esta cifra se incrementará hasta superar los 350.000 casos en el año 2050 [2]

Desde el punto de vista biológico, el cáncer se define como un grupo de enfermedades caracterizadas por un crecimiento celular anómalo y descontrolado, producto de mutaciones genéticas que alteran los mecanismos reguladores del ciclo celular. Estas mutaciones permiten que las células malignas evadan los mecanismos fisiológicos de control del organismo, se multipliquen de forma continua, y formen agregados celulares o tumores con capacidad para invadir tejidos sanos, alterar su fisiología y dar lugar a metástasis. Los cinco tipos de cáncer más frecuentes a nivel mundial en 2022, de acuerdo con el Global Cancer Observatory (GCO), fueron el cáncer de pulmón, mama, colorrectal, próstata y estómago (**Figura 1**) [3].

Este Trabajo fin de Máster se ha centrado específicamente en el melanoma, una neoplasia cutánea que, aunque representa solo el 1% de los cánceres de piel, es la forma más agresiva y letal debido a su elevada capacidad invasiva y metastásica [4]. En España, la incidencia de melanoma ha aumentado progresivamente. Entre 2003 y 2024 se ha registrado un incremento anual del 1,1% en mujeres y del 1,2% en hombres, alcanzando en 2024 un total de 7.881 nuevos casos, lo que supone una incidencia de 15 casos por cada 100.000 personas/año [5].

A pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento del cáncer, siguen existiendo importantes desafíos. La complejidad genética de los

tumores dificulta la identificación precisa de las mutaciones responsables de su aparición y progresión. Por ello, muchos tipos de cáncer se diagnostican en fases avanzadas siendo difíciles de tratar y, en consecuencia, existe un gran interés en el desarrollo de nuevas terapias más eficaces y menos agresivas.

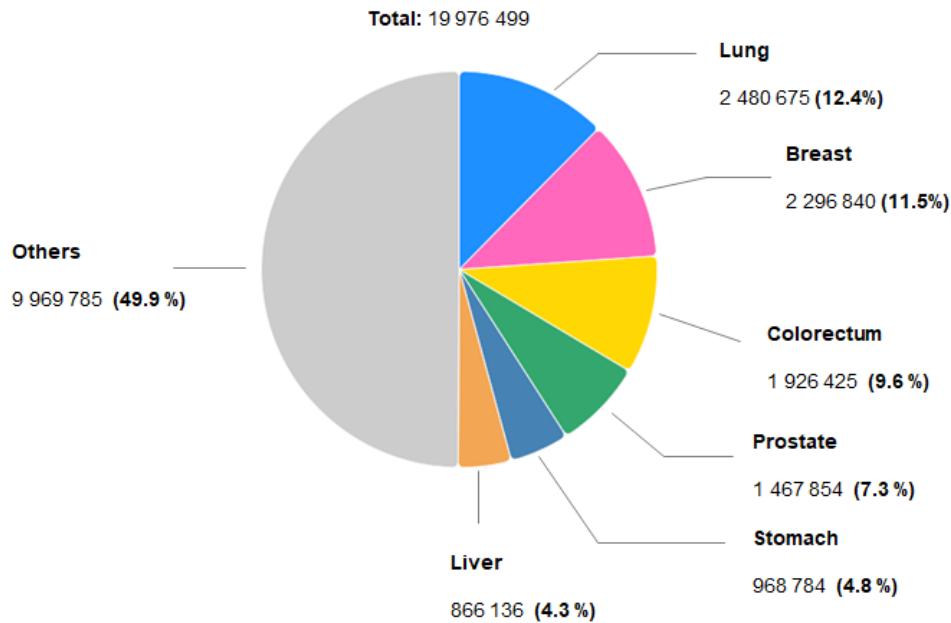


Figura 1: Gráfico con los tipos de cáncer más frecuentes a nivel mundial en 2022 según el GCO (Global Cancer Observatory). Adaptación de la web de GCO [3].

1.2 MUTACIONES SOMÁTICAS Y RESISTENCIA TUMORAL

A lo largo de nuestra vida, las células somáticas acumulan mutaciones, las cuales pueden ser neutras, perjudiciales o conferir ventajas adaptativas. En el caso del cáncer, se seleccionan aquellas alteraciones genéticas que favorecen el crecimiento descontrolado, la evasión de la muerte celular y la capacidad de invadir tejidos y propagarse a órganos distantes. Entre las principales capacidades adquiridas por las células tumorales se incluyen: el mantenimiento de señales proliferativas constantes, la resistencia a inhibidores del crecimiento, la evasión de la apoptosis (por ejemplo, mediante pérdida de función de TP53 o sobreexpresión de Bcl-2, Bcl-xL), la replicación ilimitada, la inducción de angiogénesis y la modificación de su morfología y adhesión celular, que les permite llevar a cabo la metástasis [6].

Las terapias convencionales (cirugía, quimioterapia y radioterapia) han demostrado eficacia, pero presentan limitaciones. En muchos casos, estos tratamientos afectan también a células sanas, lo que genera efectos adversos que comprometen la calidad de vida del paciente y, en ocasiones, la eficacia del tratamiento. En respuesta a estos retos, han surgido nuevas estrategias

como la inmunoterapia, la terapia génica y la terapia hormonal. No obstante, la necesidad de tratamientos más específicos y menos tóxicos sigue impulsando la investigación de alternativas innovadoras basadas en terapias avanzadas, como la nanomedicina.

1.3 APLICACIÓN DE LA NANOMEDICINA EN ONCOLOGÍA

La nanomedicina, rama de la medicina que aplica los principios de la nanotecnología, ha generado gran interés por su potencial para mejorar la eficacia de los tratamientos antitumorales actuales. Esta disciplina se basa en el uso de materiales nanoestructurados (entre 1 y 100 nm en alguna de sus dimensiones). Dado su alta relación superficie/volumen así como sus dimensiones intrínsecas, los nanomateriales exhiben propiedades únicas con potenciales aplicaciones en el ámbito médico para el diagnóstico y la terapia de una gran variedad de enfermedades.

Las nanopartículas (NPs) representan una herramienta clave dentro de la nanomedicina ya que en función de su composición, dimensiones y morfología, pueden presentar diferentes propiedades y además, pueden ser funcionalizadas con ligandos (péptidos, anticuerpos, aptámeros, etc.) y cargadas con fármacos, material genético u otras moléculas bioactivas [7]. En este trabajo se utilizaron NPs de oro huecas (HGNPs) y NPs de platino (PtNPs) como herramientas antitumorales.

Por un lado, las HGNPs son especialmente útiles en aplicaciones de terapia fototérmica, ya que presentan resonancia de plasmón superficial (SPR), una propiedad óptica que permite transformar la energía de la luz en la región del infrarrojo cercano (NIR), en energía térmica, presentando propiedades fototérmicas con potencial aplicación en el campo de la oncología. Este aumento de temperatura tras la irradiación con un láser en la región NIR permite inducir muerte celular localizada (mediante apoptosis o necrosis celular), minimizando el daño a tejidos circundantes [8]. La ventaja de este tipo de terapia es que, al tratarse de un estímulo externo, se puede regular y controlar de forma remota con gran facilidad lo que permite un menor daño en los tejidos sanos periféricos. Además, las HGNPs pueden ser recubiertas con polietilenglicol (PEG) (PEG-HGNPs) para mejorar su estabilidad en medios biológicos, prolongar su vida media en sangre y evitar su reconocimiento por parte del sistema inmunitario y su rápida eliminación hepática. Por tanto, debido a las características de este tipo de NPs, las hacen ideales para ser aplicadas en tratamientos oncológicos [9].

Por otro lado, durante muchas décadas, diferentes moléculas organometálicas basadas en platino han recibido gran atención en el campo de la medicina dadas sus propiedades terapéuticas [10]. En los últimos años, se

ha impulsado la búsqueda de otros fármacos derivados de Pt que presenten mayor eficacia antitumoral y menor toxicidad sistémica (carboplatino, oxalplatino o nedaplatino). Sin embargo, a pesar de las mejoras obtenidas, estos complejos siguen sin ser selectivos y las células sanas del organismo también se ven afectadas, dando lugar a efectos sistémicos que, en conjunto, siguen limitando su aplicación en el paciente [11]. Con el objetivo de reducir estos efectos indeseados, en los últimos años se han descrito herramientas de la nanotecnología como las PtNPs que han despertado un gran interés en la comunidad científica por su acción como agentes anticancerígenos. Las PtNPs presentan propiedades citotóxicas derivadas de su capacidad para inducir daño en el ácido desoxirribonucleico (ADN), interaccionando con la doble hélice induciendo roturas en sus cadenas y estableciendo uniones covalentes con las bases nitrogenadas del ADN y en consecuencia, bloqueando la transición y la replicación de las células tumorales, conduciendo a su apoptosis o necrosis [12] [13].

A pesar de las prometedoras aplicaciones de las HGNPs y PtNPs como agentes antitumorales sigue siendo necesario desarrollar vectores de entrega que permitan su vehiculización de manera selectiva a las células y tejidos diana para maximizar su eficacia terapéutica, minimizar su exposición a tejidos sanos y reducir los efectos secundarios asociados. Por esta razón, en el presente Trabajo Fin de Máster se emplearon vesículas extracelulares (EVs), como vectores naturales de entrega selectiva, aprovechando su capacidad para interactuar de forma específica con las células de origen, en este caso, células de melanoma.

1.4 EVs COMO VECTORES TERAPÉUTICOS

Las EVs son estructuras con morfología redonda, rodeadas de una bicapa fosfolipídica secretadas por casi todas las células y que participan en múltiples funciones fisiológicas y patológicas [14]. De acuerdo con la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV), las EVs, que no contienen núcleo funcional, constituyen un sistema de comunicación intercelular transportando proteínas, lípidos y material genético que reflejan el estado de su célula de origen. Además, se pueden encontrar en todos los fluidos biológicos (sangre, orina, saliva etc). En cuanto a sus funciones fisiológicas, se incluyen la presentación de antígenos, regulación de la muerte celular programada, angiogénesis, inflamación, coagulación y comunicación feto-madre durante el embarazo [14].

En el contexto del cáncer, la liberación de EVs es empleada por las células tumorales como una herramienta estratégica para regular la progresión tumoral a través de la modulación del microambiente y de la comunicación con otras células. En el caso particular del melanoma cutáneo, un tumor derivado

de los melanocitos, el pronóstico suele ser favorable en fases tempranas. Sin embargo, una vez que las células malignas adquieren capacidad invasiva, este tipo de cáncer se convierte en la neoplasia cutánea más agresiva y letal, debido a su elevada capacidad metastásica [14]. Diversos estudios han mostrado que las células de melanoma presentan una mayor actividad secretora de EVs en comparación con otras líneas tumorales, lo que ha convertido a los modelos de melanoma en herramientas valiosas para investigar tanto la composición como la funcionalidad de estas vesículas en el ámbito del cáncer [14].

Existe un amplio espectro de EVs secretadas por las células en función de sus propiedades físicas tales como el tamaño, el cual se encuentra en el rango 50-100 nm de diámetro, la biogénesis, carga y las funciones (**Figura 2**). Por tanto, las EVs se pueden dividir en tres clases principales: exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos [14]. Dentro de esta clasificación, los exosomas son un subtipo específico de EVs, de entre 20 y 150 nm de diámetro, originados a partir del sistema endocítico. Su membrana está enriquecida en lípidos como esfingomielina, ceramidas, fosfatidilcolina y fosfatidilserina, y contiene proteínas de fusión y transporte (anexinas, flotilinas), proteínas de choque térmico (HSP70, HSP90), y tetraspaninas como CD9, CD63 y CD81, consideradas marcadores clásicos de exosomas. Internamente transportan proteínas, péptidos, mARN, microARN e incluso ADN mitocondrial [15].

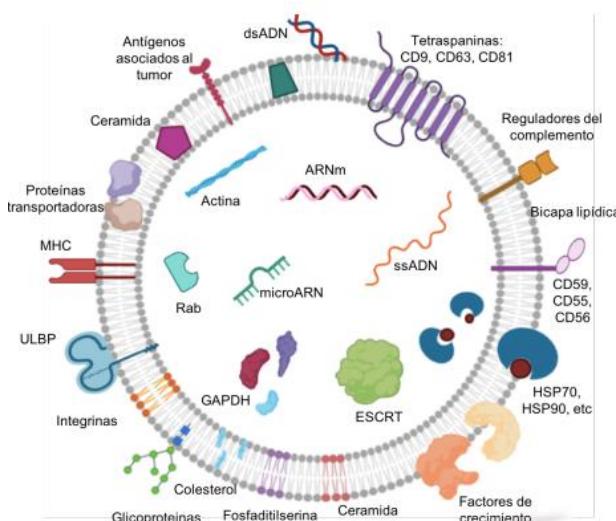


Figura 2: Composición y estructura de las EVs. Adaptación de la tesis doctoral Sancho, M. [16]

En el campo oncológico, las EVs han sido estudiadas en los últimos años como vectores naturales de entrega de fármacos gracias a su biocompatibilidad, capacidad de carga y reconocimiento, y baja inmunogenicidad. Además, pueden ser modificados para mejorar su especificidad o funcionalización con agentes terapéuticos. También se ha

demonstrado su capacidad para entregar quimioterápicos, proteínas, siARNs y NPs metálicas a células diana, lo que representa un enfoque terapéutico con gran potencial [14].

Durante los últimos años se han realizado avances en la combinación de productos nanotecnológicos con EVs. El grupo de investigación donde se ha realizado este Trabajo Final de Máster es pionero en la optimización de diferentes estrategias de encapsulación de NPs terapéuticas en EVs [25] [38]. Habitualmente, se emplean dos tipos de estrategias para incorporar los agentes terapéuticos en el interior de las EVs. Por un lado se encuentra la encapsulación forzada a través de la creación de poros en la membrana, de las EVs aisladas previamente, que favorecen la entrada de las NPs a su interior. Por otro lado, se encuentra el método de captación natural por parte de las células parentales, por el que las células secretoras incorporan las NPs deseadas en la ruta de biogénesis de las EVs, las cuales son secretadas al medio celular conteniendo las NPs terapéuticas en su interior. El método de captación natural es significativamente menos agresivo que los métodos de carga forzada, preservando la integridad y funcionalidad intrínseca de las EVs. Sin embargo, se ha demostrado que, la eficacia de encapsulación puede mejorarse aún más. Es por ello, que el grupo NFP ha reportado un método novedoso de generación *in situ* de NPs en el interior de EVs controlando la eficiencia de encapsulación de las NPs preservando así la morfología, integridad y funcionalidad de las EVs [26].

Respecto a la ruta de administración de las EVs, en los estudios *in vivo* realizados [17], las EVs pueden ser administradas por diferentes vías sistémicas para optimizar su biodistribución y dirigirlas hacia órganos o tejidos diana. La administración intravenosa es la más utilizada. Sin embargo, se ha observado que, al ser administradas por esta ruta, la mayoría de las EVs se acumulan en el hígado [17]. Por su parte, mediante inyección intraperitoneal, las EVs tienden a dirigirse al tejido adiposo [17]. Es por ello que se han explorado otras rutas que permiten una entrega más localizada y eficaz según el tipo de tejido diana, como la inyección local (permite su concentración en sitios tumorales específicos), y la administración oral [17]. Por otro lado, en los últimos años la administración por vía inhalatoria ha cobrado mayor interés debido a las ventajas que esta vía presenta como una elevada focalización en el tejido pulmonar, una amplia superficie de absorción, menores efectos adversos sistémicos así como una mayor comodidad para el paciente; de modo que estas características la hacen una vía de administración prometedora y eficiente. [18].

A pesar de estos avances, aún se requieren enfoques más sofisticados que permitan controlar con mayor precisión el direccionamiento y la acumulación selectiva de las EVs en órganos o células diana. Además, para

acelerar el uso de las EVs en el ámbito clínico, sigue siendo necesario estudiar procesos de conservación y almacenaje de las EVs que permitan mantener sus propiedades de direccionamiento y garantizar su estabilidad durante largos períodos de tiempo. Entre estas estrategias, cabe destacar la liofilización. Además, es importante mencionar que el grupo NFP patentó un nebulizador potencialmente aplicable a la inhalación de EVs para ser administradas por vía inhalatoria en forma de suspensión [43].

1.5 LIOFILIZACIÓN DE EVs

Uno de los principales retos para la aplicación clínica de las EVs es su conservación a largo plazo. Aunque pueden mantenerse estables durante algunas semanas en solución a baja temperatura, su almacenamiento prolongado puede alterar su integridad y funcionalidad. La ISEV recomienda conservarlas a -80 °C en disolución salina tamponada con fosfato (PBS), pero esta estrategia conlleva elevados costes de energía, dificultad de transporte y no garantiza la estabilidad total de las vesículas [19].

La liofilización, o secado por congelación, se postula como una solución prometedora para el almacenaje de EVs. Este proceso permite eliminar el agua de las muestras congeladas mediante sublimación y desorción al vacío, generando un producto seco que puede ser almacenado a temperatura ambiente o refrigerada con estabilidad a largo plazo. Para lograr una liofilización efectiva de EVs es imprescindible el uso de crioprotectores, como disacáridos o polímeros, que protegen las membranas fosfolipídicas de las EVs frente al estrés mecánico y oxidativo durante el proceso, favoreciendo la integridad de las moléculas implicadas en el direccionamiento y selectividad [19]. De hecho, existen varios ensayos clínicos que están evaluando como la actividad funcional y terapéutica de EVs se ve afectada por el proceso de liofilización en presencia o ausencia de diferentes crioprotectores [20].

Como se ha mencionado previamente, el presente trabajo se centró en el uso de EVs, concretamente las derivadas de células de melanoma (EVs^{B16-F10}). Es bien conocido que el melanoma maligno presenta alta capacidad metastásica, siendo el pulmón uno de los principales órganos diana. En este contexto, la liofilización de las vesículas administradas por vía inhalatoria con el objetivo de dirigirlas hacia las metástasis pulmonares representa un enfoque terapéutico innovador y prometedor. Sin embargo, este tipo de estrategia aún se encuentra en fase de investigación, principalmente debido a los desafíos técnicos asociados a la formulación, estabilidad y liberación eficaz de nanomateriales por esta vía. Por tanto, debido al creciente interés por el desarrollo de sistemas terapéuticos basados en nanomateriales aerosolizados, la optimización del proceso de liofilización constituye un paso clave para posibilitar la administración de estas EVs por vía inhalatoria [21].

A pesar de que en los últimos cinco años se ha explorado el uso de liofilización de EVs, actualmente no existen trabajos que combinen la liofilización de EVs cargadas con NPs terapéuticas en su interior; ni como esta liofilización afecta a las propiedades terapéuticas y de direccionamiento de las NPs encapsuladas en el interior de las EVs.

Considerando los puntos anteriormente descritos, la combinación de nanotecnología y EVs representa una de las estrategias más innovadoras en el desarrollo de terapias dirigidas contra el cáncer. No obstante, existen limitaciones técnicas como la carga eficiente y específica de NPs en las EVs, la estandarización de su purificación, el entendimiento completo de sus interacciones en entornos biológicos, así como su almacenaje y conservación. Por tanto, resolver estos desafíos es esencial para acelerar la aplicación de estas nuevas terapias avanzadas emergentes desde modelos experimentales hacia aplicaciones clínicas reales.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este Trabajo Final de Máster es la optimización del proceso de liofilización de EVs cargadas con NPs terapéuticas. Para ello, se evaluará el uso de distintos crioprotectores con el fin de preservar la integridad estructural de las EVs y sus propiedades fisicoquímicas y funcionales, con el propósito de mejorar su capacidad de direccionamiento selectivo hacia las células diana. Este enfoque tiene como finalidad maximizar la eficacia terapéutica antitumoral de las NPs encapsuladas en el interior de las EVs.

Dado el carácter multidisciplinar del estudio, se han definido los siguientes objetivos específicos que permitirán alcanzar el propósito general del estudio:

1. Sintetizar y caracterizar NPs terapéuticas de diferentes metales.
2. Aislart y caracterizar EVs de células tumorales a partir de cultivos celulares.
3. Optimizar el proceso de liofilización de las EVs mediante el estudio comparativo del efecto de distintos crioprotectores.
4. Encapsular eficientemente las NPs terapéuticas en las EVs aisladas.
5. Evaluar la capacidad de internalización y especificidad celular de las EVs cargadas para comprobar su comportamiento diferencial y su potencial como sistemas de direccionamiento selectivo.
6. Determinar la eficacia terapéutica de los híbridos NPs-EVs en las células tumorales diana.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección se detalla la metodología empleada a lo largo del Trabajo Fin de Máster. Se describen las condiciones de cultivo y mantenimiento de las líneas celulares utilizadas, así como los protocolos aplicados para los ensayos de internalización celular, selectividad de las EVs, citotoxicidad y tratamiento fototerapéutico mediante irradiación láser. Además, en este apartado también se incluye la descripción detallada del procedimiento seguido para el aislamiento de las EVs a partir de cultivos celulares, así como las técnicas utilizadas para su caracterización, con el fin de confirmar su naturaleza exosomal y evaluar su calidad. También se aborda el proceso de liofilización de las EVs, incluyendo las condiciones experimentales empleadas, el uso de crioprotectores, y las estrategias adoptadas para optimizar su estabilidad estructural y funcional durante y tras la liofilización. Del mismo modo, se explican las técnicas empleadas para la síntesis de las NPs utilizadas en este trabajo, así como su caracterización fisicoquímica, incluyendo los métodos utilizados para determinar su tamaño, morfología, composición y estabilidad. Estos aspectos son fundamentales para garantizar la reproducibilidad y la validez de los resultados obtenidos, los cuales se muestran más adelante (en el apartado de resultados).

3.1 LÍNEAS CELULARES

3.1.1 MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS CELULARES

Las líneas celulares empleadas en este trabajo fueron las células B16-F10 y NIH-3T3, derivadas de melanoma metastásico murino y fibroblastos sanos murinos, respectivamente. Ambas líneas celulares fueron empleadas para los ensayos de selectividad, internalización, fototerapia y toxicidad celular que se explicarán más adelante. En el caso de las células B16-F10, estas también fueron empleadas como la línea parental secretora de las EVs empleadas a lo largo de todo el trabajo.

En cuanto al mantenimiento de las células, se empleó el medio de cultivo Eagle modificado por Dubelcco (DMEM) 4,5 g/L glucosa, el cual fue suministrado por la casa comercial Sigma Aldrich. Además, el medio de cultivo fue suplementado con dos antibióticos (penicilina y estreptomicina, 1 %) y un antifúngico (anfotericina, 1 %) que fueron suministrados en este caso por Biowest, así como también con L-Glutamina (1%) y suero fetal bovino (FBS) al 10 %, obtenido de Gibco. Las condiciones de crecimiento, así como las características del medio empleado para ambas líneas celulares se encuentran resumidas en la **Tabla 1**. La manipulación de las células se realizó en una campana de flujo laminar vertical en condiciones de esterilidad. Así como también se llevó a cabo un test mensual de micoplasma para asegurar la ausencia de contaminación.

Línea celular	Origen	Medio de cultivo	Suplementos	Condiciones crecimiento
B16-F10	Melanoma murino	DMEM 4,5 g/L glucosa	1% Penicilina/Estreptomicina/Anfotericina 10% FBs	37°C, normoxia (5% CO ₂)
NIH-3T3	Fibroblastos murinos	DMEM 4,5 g/L glucosa	1% Penicilina/Estreptomicina/Anfotericina 10% FBs	37°C, normoxia (5% CO ₂)

Tabla 1: Líneas celulares empleadas, medio de cultivo, suplementos y condiciones de crecimiento utilizado.

3.1.2 CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE LAS CÉLULAS

Con el fin de preservar la viabilidad celular así como mantener las características genéticas y fisiológicas estables durante largos períodos de tiempo, las líneas celulares se encontraban almacenadas en un tanque de nitrógeno líquido, a una temperatura de -195°C.

Para llevar a cabo la congelación de las células, estas fueron tratadas con tripsina y lavadas dos veces con PBS 1x (5 minutos, 200 g). Tras la centrifugación, el *pellet* obtenido se re-suspendió en medio de congelación (compuesto por FBS y dimetilsulfóxido (DMSO) en una proporción 90:10 (v:v)). El DMSO, es un crioprotector que penetra en las membranas celulares evitando la formación de cristales de hielo dentro de la célula así como también permite la estabilización de las proteínas y membranas celulares durante la congelación y descongelación. Las células fueron finalmente trasladadas a crioviales, los cuales se colocaron en un *cryocooler* almacenado a una temperatura de -80 °C en un ultra congelador durante 24 horas y, posteriormente, se transfirieron a un tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento final.

En cuanto a la descongelación celular, el proceso se realizó rápidamente, y los crioviales almacenados en nitrógeno líquido se incubaron en un baño a 37 °C durante 1 minuto. Una vez descongelados, las células se centrifugaron durante 5 minutos a 200 g con el fin de eliminar los restos de DMSO. Finalmente, las células fueron incubadas en una placa en las condiciones habituales de crecimiento. Pasadas 24 h, se cambió el medio de cultivo por nuevo medio fresco.

3.2 AISLAMIENTO DE EVs^{B16-F10} POR ULTRACENTRIFUGACIÓN

En primer lugar, se cultivaron las células B16-F10 en placas p100. Para ello, se mantuvieron en crecimiento en las condiciones óptimas correspondientes descritas anteriormente. Una vez alcanzado el 80% de confluencia celular, se sustituyó el medio de cultivo por uno denominado ULTRACEN, que estaba suplementado con los antibióticos y el antifúngico anteriormente mencionados, y Enriquecido con FBS libre de exosomas, el cual

fue previamente ultracentrifugado durante 2 horas a 100.000 g y 4°C para eliminar los exosomas naturales presentes en el suero.

Tras 48h se recogió el sobrenadante de las placas y se procedió a realizar una serie de ciclos sucesivos de ultracentrifugación, representados en la **Figura 3**, para iniciar con la purificación de las EVs producidas por las células B16-F10 parentales ($\text{EVs}^{\text{B16-F10}}$).

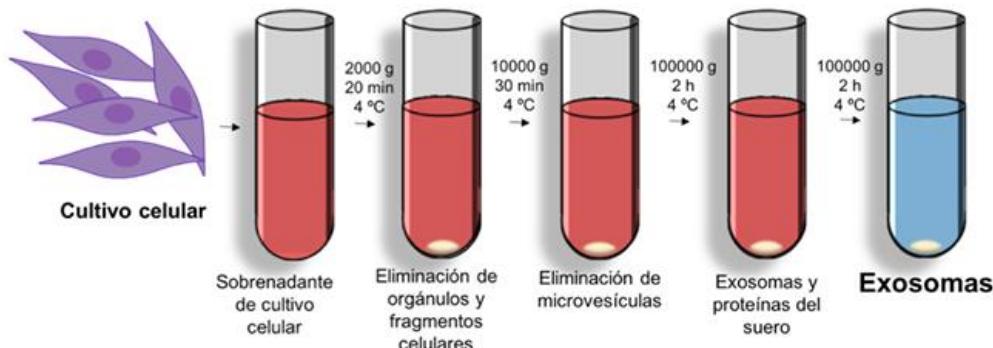


Figura 3: Esquema del proceso de aislamiento de las EVs a partir de cultivos celulares por rondas sucesivas de ultracentrifugación. Adaptada de la tesis doctoral de Sancho, M. [16]

Estas rondas de centrifugación seriadas, se realizan con el objetivo de separar el resto de componentes y sustancias presentes en el sobrenadante de las EVs de interés. Para ello, se llevó a cabo un primer ciclo de centrifugación a 2.000 g y 4°C durante 20 minutos, con el fin de eliminar el *pellet* que contenía los componentes más pesados que pudiera haber en el sobrenadante tales como fragmentos y orgánulos celulares. Seguidamente, se volvió a centrifugar el sobrenadante, en este caso a 10.000 g y 4°C durante 30 minutos para eliminar las microvesículas de mayor tamaño. Una vez descartado el *pellet*, el sobrenadante fue ultracentrifugado (100.000 g, 4°C durante 2 h), para obtener el *pellet* de EVs junto con proteínas presentes en el suero. Tras descartar el sobrenadante por decantación, se lavó el *pellet* en PBS 1x y se llevó a cabo una última ultracentrifugación (100.000 g, 4°C durante 2 h) para eliminar las posibles proteínas contaminantes. El *pellet* final fue re-suspendido en PBS 1x obteniendo las $\text{EVs}^{\text{B16-F10}}$ de interés, que fueron caracterizadas posteriormente.

3.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS EVs $^{\text{B16-F10}}$

Una vez aisladas las $\text{EVs}^{\text{B16-F10}}$, se procedió a su caracterización empleando diversas técnicas biológicas y fisicoquímicas. Esta caracterización fue fundamental para evaluar la morfología, integridad y funcionalidad de las $\text{EVs}^{\text{B16-F10}}$, asegurando que las propiedades clave se mantuvieran tras los procesos de carga y manipulación experimental. Entre las metodologías empleadas se incluyeron la cuantificación de proteína total mediante el ensayo del ácido bicinchonírico (BCA), expresión de marcadores asociados a EVs por citometría de flujo, análisis de rastreo de nanopartículas (NTA, del inglés *Nanoparticle Tracking Analysis*), potencial zeta y microscopía electrónica de transmisión (TEM).

3.3.1 CUANTIFICACION DE PROTEÍNA TOTAL POR BCA

La técnica de BCA se empleó para determinar la concentración de EVs^{B16-F10} en forma de proteína total. Esta técnica consiste en la formación de un complejo de proteína y cobre (proteína-Cu²⁺), seguido de la reducción del cobre de Cu²⁺ a Cu⁺ en condiciones alcalinas. Finalmente, el ácido bicinconínico, el cual es un reactivo cromogénico, se une de manera específica al cobre (Cu⁺) formando un complejo estable de color azulado-morado, que absorbe a una longitud de onda de 562 nm. De modo que la absorbancia medida a esta longitud de onda es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la solución, que puede ser obtenida por comparación con una recta patrón de estándares de concentración conocida (0-2000 µg/mL) realizada con albúmina sérica (BSA) (**Figura A5 en los Anexos**). Los estándares y la muestra se añadieron en una placa de 96 pocillos, y se incubaron con la solución de trabajo (EVs^{B16-F10} aisladas) conteniendo el BCA durante 30 minutos a 37 °C siguiendo las especificaciones del Kit de ensayo de proteínas BCA de microplacas Pierce™ de la casa comercial Thermo Scientific™. Finalmente, se procedió a la lectura de la absorbancia a 562 nm utilizando un lector de placas Synergy HT.

3.3.2 TEM

El análisis por TEM consiste en la irradiación de una muestra ultra fina con un haz de electrones con el fin de obtener imágenes de la misma. El microscopio electrónico empleado para la caracterización de las EVs^{B16-F10} así como de las NPs sintetizadas pertenece al Laboratorio de Microscopías Avanzadas (LMA) del INMA, concretamente se empleó el modelo T20-FEI Tecnai. La preparación de las muestras analizadas por esta técnica consistió en depositar una gota de la disolución de interés sobre una rejilla de carbono/Formvar de 2 mm de diámetro, la cual se colocó sobre un papel desecante, favoreciendo la evaporación del disolvente. En cuanto a las rejillas empleadas, eran de cobre con recubrimiento. Para poder visualizar las EVs al TEM, se empleó el ácido fosfotungstico (PTA) al 3% como agente de contraste.

3.3.3. Potencial zeta

La técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS), aporta información sobre la distribución del tamaño hidrodinámico y sobre la carga superficial (potencial zeta) del material mediante la luz dispersada por el mismo. Para medir la carga superficial de las EVs^{B16-F10} disueltas en PBS 1x a un pH=7, se empleó el equipo Brookhaven 90 plus y el software ZetaPALS (Brookhaven Instruments Co.).

El potencial zeta proporciona una estimación cuantitativa de la estabilidad coloidal de una suspensión de partículas. Valores absolutos elevados de potencial zeta, ya sean positivos o negativos, indican una fuerte repulsión electrostática entre las partículas, lo que previene su agregación y confiere mayor estabilidad a la dispersión. En cambio, cuando el valor del

potencial zeta se encuentra cercano a cero, las fuerzas atractivas superan a las repulsivas, lo que favorece la agregación de las partículas presentes en la disolución y, por tanto, una menor estabilidad de la suspensión.

3.3.4 NTA

El análisis por NTA permite la visualización y la determinación del tamaño hidrodinámico y la concentración de una disolución de partículas. A través de esta técnica se determinó tanto el tamaño como la concentración de las EVs^{B16-F10}, en PBS 1x a pH=7. El análisis por NTA relaciona el movimiento browniano aleatorio de las partículas en suspensión y las propiedades de dispersión de la luz con el tamaño de las mismas y su concentración. Para este análisis se empleó el equipo Nanosight NS500 (Malvern Panalytical).

3.3.5 ANÁLISIS multiplex MACSPlex EV POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Esta técnica se fundamenta en los principios de los inmunoensayos convencionales, como ELISA, combinados con la citometría de flujo utilizando microesferas de látex funcionalizadas con anticuerpos específicos. En este estudio, se empleó el Kit MACSPlex EV (Miltenyi Biotec) siguiendo las especificaciones de la casa comercial. Finalmente, la expresión de los marcadores asociados a las EVs se analizó usando el citómetro Gallios (Beckman Coulter) [37]. Esta tecnología permite el análisis simultáneo de hasta 37 marcadores de superficie específicos de EVs, lo cual proporciona un perfil detallado de su composición proteica. Gracias a esto, se pudo evaluar si existían variaciones en la expresión de dichos marcadores en función de diferentes condiciones experimentales, como la presencia o ausencia de crioprotectores durante la liofilización o la encapsulación de las NPs en las EVs.

3.4 SÍNTESIS Y ENCAPSULACIÓN DE NPs EN EVs^{B16-F10}

Como se ha mencionado anteriormente, en el presente Trabajo Fin de Máster se han empleado dos metodologías diferentes para encapsular dos tipos de NPs:

- El método seguido para encapsular las PEG-HGNPs en EVs^{B16-F10} (HG-EVs^{B16-F10}) se basó en la captación natural de la carga en las EVs^{B16-F10} [38]. Para ello, las NPs en cuestión se incubaron con las células parentales (B16-F10), lo cual favorece su internalización e incorporación en la ruta de biogénesis de las EVs.
- Por otro lado, en el caso de las PtNPs se encapsularon en el interior de las EVs^{B16-F10} (Pt-EVs^{B16-F10}) utilizando el método de reducción y generación *in situ* con CO [26]. La ventaja de emplear este método de encapsulación es que no implica la utilización de métodos exógenos agresivos que puedan comprometer o dañar la integridad o funcionalidad de la membrana de las EVs.

A continuación, se describen ambas estrategias empleadas.

3.4.1 SÍNTESIS Y ENCAPSULACIÓN de PEG-HGNPs: Generación de HG-EVs^{B16-F10}

Para generar las HG-EVs^{B16-F10}, en primer lugar se sintetizaron las HGNPs mediante un procedimiento completamente independiente sin requerir la presencia de EVs^{B16-F10} durante el proceso.

Para la síntesis de estas NPs se emplearon los siguientes reactivos: Cloruro de Cobalto (II) hexahidratado, Citrato de Sodio tribásico dihidratado, Poli (vinilpirrolidona) (PVP) Mm=55000 Da, Borohidruro de Sodio y Ácido Cloroáurico (III) (pureza 50%). También se empleó metil-tiol-PEG Mm=1000 Da, para la posterior pegilación de las nanopartículas sintetizadas (PEG-HGNPs). Todos los reactivos mencionados fueron suministrados por la casa comercial Sigma Aldrich.

Estas NPs se sintetizaron siguiendo el protocolo establecido por Preciado-Flores et. al (2010) ligeramente modificado [22]. El primer paso para sintetizar este tipo de NPs fue preparar la solución inicial. En un matraz redondo de dos cuellos, se añadieron 400 mL de agua destilada y 400 µL de una solución acuosa de cloruro de cobalto (II) hexahidratado al 0.4 M. También se añadieron 1.6 mL de citrato de sodio tribásico dihidratado al 0.01 M. Este proceso se realizó sin agitación magnética y bajo una atmósfera inerte de argón durante 45 minutos, tiempo en el cual se sintetizaron las NPs de cobalto, que actúan como un núcleo sacrificial. A continuación, se agregaron 2 mL de una solución al 0.1% (p/v) de polivinilpirrolidona (PVP) y 400 µL de borohidruro de sodio al 1 M al matraz inicial, mezclando con agitación magnética durante 15 minutos. La atmósfera siguió siendo inerte. En este paso se pudo observar un cambio del color de la mezcla, de rosa pálido a marrón oscuro, lo que indicó la formación de las NPs de cobalto. El PVP ayudó a controlar la morfología de las NPs, actuando como un estabilizador. Seguidamente, se trasladaron 380 mL de esta mezcla a otro matraz de 500 mL que contenía 120 mL de agua destilada y 360 µL de ácido cloroáurico al 0.1 M, pero esta vez sin la atmósfera de argón y con agitación magnética. Al añadir el ácido cloroáurico, las NPs de cobalto se oxidaron, generando cloruro de cobalto y óxido de cobalto, al mismo tiempo que se redujo el Au³⁺ a Au⁰, formando las HGNPs. Este proceso resultó en un cambio de color de marrón oscuro a azul turquesa, indicando la formación de las NPs.

Finalmente, para purificar las HGNPs, los restos de reactivos se eliminaron mediante dos centrifugaciones de la mezcla a 10.000 g durante 10 minutos cada una.

El último paso fue la PEGilación de las HGNPs generadas (PEG-HGNPs). Para ello, primero se calculó la concentración de las nanopartículas en la solución mediante pesada. Seguidamente se preparó una solución de

metil-tiol-PEG de 1000 Da que se fue añadiendo gota a gota sobre una dispersión de las nanopartículas en una proporción 1:1 (p/p) en agitación orbital durante 1 h, asegurando un exceso del polímero. Finalmente, se centrifugó a 15.000 g durante 10 minutos para eliminar el exceso de PEG no adherido [20]. El grupo tiol del PEG presenta alta afinidad por los metales, en este caso el oro, facilitando la formación de un enlace químico con las NPs previamente sintetizadas (**Figura 4**).

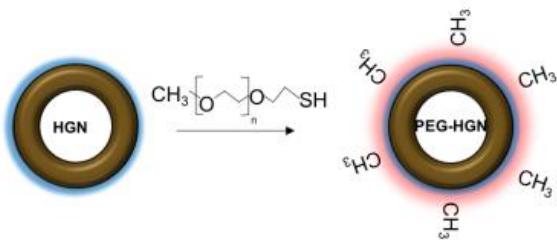


Figura 4: Ilustración de la pegilación de las HGNPs debido a la alta afinidad del oro con los grupos tiol presentes en el PEG. Adaptación de la tesis doctoral de Sancho,M.[16]

Una vez sintetizadas las PEG-HGNPs, estas fueron caracterizadas por TEM y potencial zeta (descritos anteriormente en las secciones 3.3.2 y 3.3.3, respectivamente). Además, dada la naturaleza de las PEG-HGNPs y su efecto SPR, estas también fueron caracterizadas por la técnica del ultravioleta visible (UV-VIS).

3.4.1.1 CARACTERIZACIÓN POR UV-VIS

Según el material, tamaño y morfología de las NPs metálicas sintetizadas, se pueden obtener diferentes máximos de absorbancia debido al fenómeno SPR. Es por ello que a través del estudio del patrón de absorbancia de la región UV-VIS así como del espectro NIR, se pudo comprobar las características de las NPs sintetizadas, tales como sus propiedades de absorción, morfología y tamaño, y corroborar de esta manera si eran óptimas para la aplicación de interés de este trabajo. El patrón de absorbancia tanto en la región UV-VIS como en el NIR se encuentra relacionado directamente con la energía de transición de los electrones según su distribución en la molécula. La alteración de la intensidad de la luz causada por la absorción y/o difusión de ésta al interactuar con la muestra se puede explicar mediante la ley de Beer-Lambert. Concretamente el patrón de absorbancia UV-VIS de las PEG-HGNPs fue medido en el rango de 400-1300 nm utilizando el espectrofotómetro UV-VIS V-67 de Jasco, y se tomó como línea base la absorbancia de agua destilada.

3.4.1.2 ANÁLISIS CITOTOXICIDAD METABÓLICA

Como paso previo a la encapsulación de las PEG-HGNPs en las EVs^{B16-F10} fue necesario evaluar su biocompatibilidad con el fin de optimizar las condiciones experimentales que permitiese maximizar la eficacia de encapsulación siguiendo el método de captación natural.

La citotoxicidad metabólica de las PEG-HGNPs se obtuvo mediante el ensayo de Blue Cell, mediante el kit de ensayo Blue Cell Viability (Abnova). Para ello, se sembraron las células objetivo (B16-F10) en placas de 96 pocillos a una densidad de 4.000 células/pocillo. Pasadas 24 h, se añadieron las PEG-HGNPs, en diferentes concentraciones. La concentración máxima fue de 1 mg/mL, y a partir de esta se realizaron diluciones seriadas para los pocillos siguientes, obteniéndose las siguientes concentraciones: 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 y 0,015 mg/mL y se dejaron incubar con las células durante 24, 48 y 72 horas. Pasado el tiempo de incubación con las NPs, las células se lavaron tres veces con PBS 1x y, a continuación, se añadió el reactivo Blue Cell siguiendo las especificaciones de la casa comercial (**Figura A6 en Anexos**). Mediante este ensayo se determinó la dosis subcitotóxica de las partículas, la cual fue empleada para generar las HG-EVs^{B16-F10} mediante el método de captación con células parentales.

Para llevar a cabo la encapsulación de las PEG-HGNPs en las EVs^{B16-F10} (HG-EVs^{B16-F10}), una vez identificada la concentración a la cual no induce toxicidad (0,125 mg/mL), se sembraron células B16-F10 en placas p100 con DMEM completo fresco y se dejaron durante 24 horas. Pasado este tiempo, se procedió a aspirar el sobrenadante y sustituirlo por 7 mL de medio fresco conteniendo PEG-HGNPs a 0,125 mg/mL y se incubó durante 24 h más. De esta manera, las NPs son incorporadas en endosomas tempranos que, posteriormente, maduran a endosomas tardíos sobre los cuales se producirán invaginaciones de la membrana para formar un cuerpo multivesicular (MVB) que contiene las NPs en su interior. Finalmente, el MVB se fusiona con la membrana plasmática para liberar las HG-EVs^{B16-F10} (**Figura 5**).

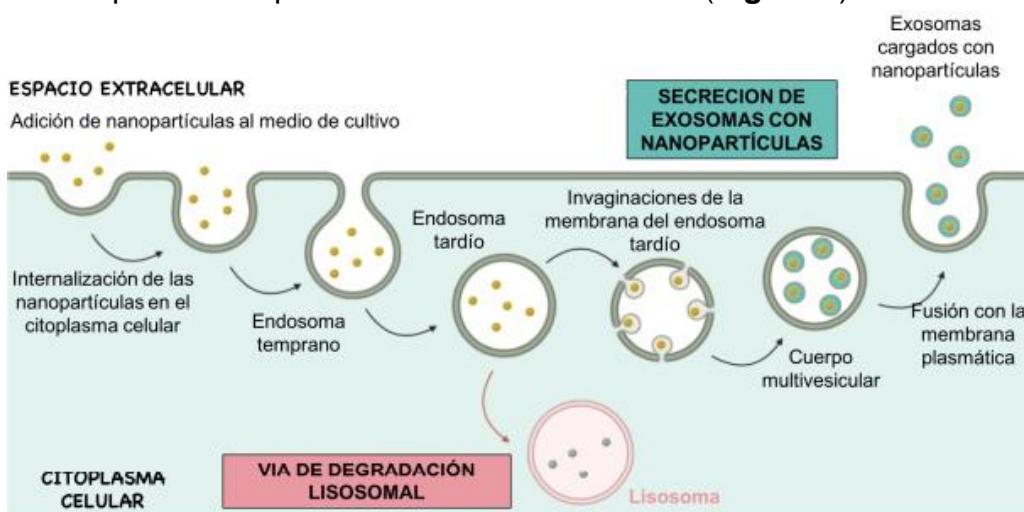


Figura 5: Esquema de encapsulación de NPs en EVs siguiendo el método de captación natural por parte de las células parentales. Adaptada de la tesis doctoral de Sancho, M. [16]

Pasadas estas 24 h, las células fueron lavadas con PBS 1x para eliminar las PEG-HGNPs no internalizadas y se incubaron durante 48 h con medio ULTRACEN. Finalmente, se recogió el sobrenadante de todas las placas y se procedió a aislar las HG-EVs^{B16-F10} por medio de rondas sucesivas de

ultracentrifugación siguiendo el mismo procedimiento detallado en el apartado 3.2). Las HG-EVs^{B16-F10} fueron caracterizadas por la batería de técnicas biológicas y fisicoquímicas descritas en la sección 3.3.

3.4.2 SÍNTESIS Y ENCAPSULACIÓN DE LAS PtNPs: Generación de Pt-EVs^{B16-F10}

Como se ha mencionado anteriormente, para encapsular las PtNPs se siguió el método de generación *in situ* con CO [26]. Para ello, en primer lugar se procedió a la purificación de EVs^{B16-F10}, así como a la determinación de la cantidad de proteína total por medio de un ensayo BCA, ambos procesos se han descrito en los apartados 3.2 y 3.3.1 respectivamente.

Posteriormente, un precursor iónico de las PtNPs se incubó con las EVs^{B16-F10} durante 12 horas a temperatura ambiente. Concretamente, el ácido cloroplatínico (H_2PtCl_6 , 8% pureza en H_2O , $M_m=409,81 \text{ g/mol}$) se incubó a una concentración de 0,06 mM. Durante esta incubación, se produce la difusión al interior de las EVs del ión metálico del precursor mediante difusión pasiva a través de su membrana. Este proceso está impulsado por la diferencia de concentración entre el medio externo y el interior de las EVs, hasta alcanzar el equilibrio [26] [34]. Transcurrido el tiempo de incubación, se eliminó el exceso de precursores metálicos no internalizados mediante una ultracentrifugación a 100.000 g durante 2 horas a 4°C. El sobrenadante fue desecharido y el *pellet* obtenido, el cual contenía las EVs^{B16-F10} cargadas con los iones metálicos, se re-suspendió en 1 mL de PBS 1x.

El último paso para sintetizar las PtNPs consistió en introducir la solución anterior en un reactor de alta presión (autoclave) con recubrimiento de teflón, al que se añadió monóxido de carbono (CO) como agente reductor hasta alcanzar una presión de 6 bar. La reacción se llevó a cabo a 30°C durante 40 minutos, manteniendo la mezcla en agitación dentro de un baño de agua para asegurar una temperatura homogénea. Finalizado el tiempo de reacción, se introdujo aire en el reactor con el fin de eliminar el CO y detener así la reducción de los iones metálicos, al mismo tiempo que garantizar la seguridad en la apertura del sistema. De manera que el vial finalmente contenía las EVs^{B16-F10} con las PtNPs sintetizadas en su interior (Pt-EVs^{B16-F10}). El proceso de generación *in situ* se muestra resumido en la **Figura 6**.

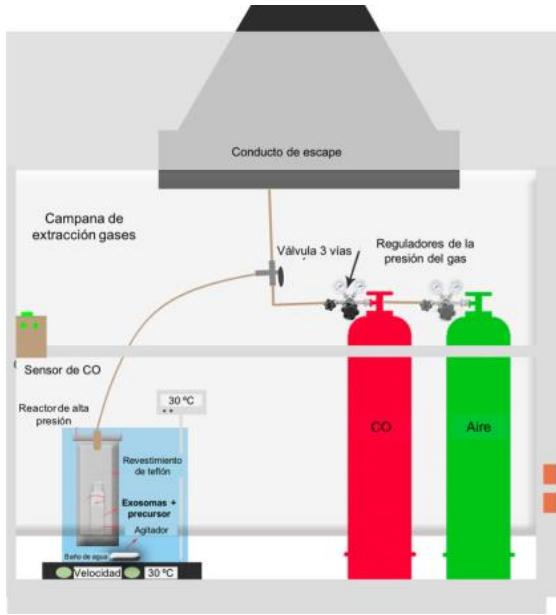


Figura 6: Ilustración de la campana de extracción de gases que contiene el autoclave recubierto con teflón, dentro del cual se encuentra el vial con las EVs^{B16-F10} cargados con los precursores metálicos. El esquema también muestra las botellas de CO y aire conectados a una llave de tres vías para llevar a cabo la reducción de los precursores iónicos localizados en el interior de las EVs. Adaptada de Sebastián, V. et al [26].

Es importante mencionar que el CO es un gas altamente tóxico, inflamable, incoloro e inodoro, capaz de unirse a proteínas como la hemoglobina, mioglobina y citocromo C oxidasa, interfiriendo con el transporte de oxígeno y generando estrés hipódico. Por esta razón, todo el procedimiento se llevó a cabo bajo estrictas condiciones de seguridad, incluyendo el uso de detectores de CO calibrados conforme al valor límite ambiental de exposición de corta duración (VLA-EC), fijado en 20 ppm según el Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (INSST).

3.4.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS NPs-EVs^{B16-F10} (HG-EVs^{B16-F10} y Pt-EVs^{B16-F10})

Una vez encapsuladas las NPs en el interior de las EVs^{B16-F10} por los métodos descritos en las secciones anteriores, se procedió a su caracterización físicoquímica y biológica con el fin de confirmar si su funcionalidad, morfología e integridad estaban preservadas en presencia de las NPs en su interior.

Para caracterizar las HG-EVs^{B16-F10} y Pt-EVs^{B16-F10} se evaluaron en primer lugar las propiedades morfológicas de las EVs^{B16-F10} con NPs en su interior por TEM, NTA y potencial zeta. Además, se determinó la expresión de los marcadores asociados a las EVs^{B16-F10} por citometría de flujo. Todas estas técnicas fueron realizadas, siguiendo los procedimientos descritos previamente en la sección 3.3.

En el caso de las Pt-EVs^{B16-F10}, las NPs en su interior fueron estudiadas por TEM de alta resolución (TITAN) utilizando un microscopio FEI TITAN

analítico (Low-base) y llevando a cabo un análisis de microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM) utilizando un detector anular de campo oscuro de gran ángulo (HAADF) (STEM-HAADF) en un microscopio XFEG TITAN operado a 300 kV y equipado con un corrector CETCOR con sonda CS de la compañía CEOS, permitiendo la formación de una sonda electrónica de 0,08 nm. Además, la microscopía electrónica permite analizar la composición química de una muestra por un análisis de dispersión de energía de rayos X (EDX) empleando electrones de alta energía. Para ello, se empleó un detector EDAX, el cual permite realizar experimentos de espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) en modo escaneo (FEI Inspect F30).

La combinación de todas estas técnicas proporcionó información detallada y fiable sobre las propiedades fundamentales de las NPs sintetizadas, permitiendo validar su uso en las posteriores aplicaciones experimentales del estudio.

3.5 LIOFILIZACIÓN DE LAS EVs^{B16-F10}

3.5.1 LIOFILIZACIÓN Y CARACTERIZACION DE EVs

La liofilización, o secado por congelación, es una técnica eficaz para conservar materiales biológicos sensibles como proteínas, células o vesículas extracelulares (EVs). Consiste en eliminar el agua mediante sublimación al vacío tras la congelación, permitiendo un almacenamiento prolongado sin pérdida significativa de propiedades biológicas. Sin embargo, diversos estudios, como el de Lőrincz et al. (2014) [35], han evidenciado que incluso a -80 °C las EVs pueden perder funcionalidad, lo que resalta la utilidad de la liofilización en aplicaciones biomédicas.

Es por ello que, para que la liofilización sea eficaz, es fundamental el uso de crioprotectores adecuados. Estas sustancias, que generalmente son compuestos hidrosolubles como disacáridos o polímeros, actúan protegiendo las vesículas frente a los daños inducidos por las tensiones físicas y químicas a las que se ven sometidas durante los procesos de congelación y secado [31]. Tal y como se describe en estudios recientes [31] [36], los crioprotectores no solo previenen la formación de cristales de hielo sino que además estabilizan la estructura tridimensional de las vesículas mediante interacciones moleculares como los enlaces de hidrógeno.

En este Trabajo Fin de Master se llevó a cabo un protocolo de liofilización de EVs utilizando diferentes crioprotectores con el objetivo de determinar cuál de ellos preservaba mejor sus características morfológicas y funcionales a largo plazo. Tras una revisión bibliográfica exhaustiva [28- 33], se seleccionaron los siguientes compuestos, representados en la **Tabla 2**, por ser los más utilizados en la literatura científica.

Crioprotector	Casa Comercial
D-Manitol	Fluka (Biochemika)
Sacarosa (pureza 89,5%)	Sigma-Aldrich
D-Trehalosa dihidratada	Sigma-Aldrich
Polivinilpirrolidona (PVP, Mm= 10.000 Da)	Sigma-Aldrich

Tabla 2: Selección de crioprotectores para la liofilización de las EVs^{B16-F10} y la casa comercial de la que se han obtenido.

Las EVs^{B16-F10} se aislaron mediante ciclos de ultracentrifugación (proceso descrito en el apartado 3.2). Posteriormente, fueron diluidas en disoluciones acuosas de los distintos crioprotectores, todos ellos se encontraban a una concentración de 10 mM en agua desionizada.

En cuanto a las condiciones de liofilización, se prepararon cinco muestras, cada una contenía 40 µg de EVs^{B16-F10} disueltas en 1 mL del crioprotector correspondiente. Las condiciones experimentales incluyeron un control sin crioprotector (solo agua desionizada), y soluciones individuales con manitol, trehalosa, sacarosa y PVP.

Antes de ser sometidas a la liofilización, todas las muestras fueron pre-congeladas durante 2-4 minutos en nitrógeno líquido (-195 °C) debido a que un enfriamiento ultrarrápido favorece la formación de hielo amorfo, lo cual reduce el riesgo de formación de cristales grandes que podrían dañar las membranas lipídicas, preservando así la integridad de las EVs^{B16-F10}. Además, la literatura indica que las muestras sometidas a este tipo de pre-congelación muestran una mejor recuperación de su funcionalidad tras la rehidratación, lo que contribuye a mantener su eficacia biológica [36].

La liofilización previamente dicha, se realizó durante 24 horas utilizando un equipo LyoQuest –55 °C de Telstar, garantizando un secado completo bajo condiciones controladas de vacío y temperatura. Tras este proceso, las muestras fueron reconstituidas en PBS 1x y almacenadas a 4 °C para su posterior análisis [31].

Para caracterizar la morfología, la integridad estructural, la estabilidad coloidal, así como la preservación funcional de las EVs^{B16-F10} liofilizadas, se emplearon las técnicas descritas anteriormente en la sección 3.3 (TEM, NTA y potencial zeta).

Además, se realizó un análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para determinar la presencia de los diferentes crioprotectores en las EVs^{B16-F10} liofilizadas. La técnica del FTIR permite estudiar la estructura molecular de una muestra a partir de la interacción entre la radiación infrarroja y sus enlaces químicos. Las distintas vibraciones moleculares producen una absorción específica de energía, generando un espectro característico que actúa como una huella molecular, ofreciendo

información precisa sobre la composición química y los grupos funcionales presentes. En este estudio se utilizó para caracterizar tanto los crioprotectores seleccionados como las EVs^{B16-F10} en diferentes condiciones: sin liofilizar y tras el proceso de liofilización con cada uno de los crioprotectores empleados. El objetivo fue verificar si la liofilización con estos compuestos inducía alteraciones en la estructura química o en la integridad molecular de las vesículas así como verificar la presencia de la huella molecular de los diferentes crioprotectores en las EVs^{B16-F10} liofilizadas. En cuanto a la instrumentación utilizada, fue un espectrómetro VERTEX 70 de Bruker Optics, equipado con un detector DTGS y un accesorio *Golden Gate Diamond ATR*, que permite el análisis directo de muestras sólidas con alta resolución espectral.

3.6 DETERMINACION DE LA ESTABILIDAD DE LAS EVS^{B16-F10} LIOFILIZADAS

Tras evaluar el análisis estructural y composicional de las EVs liofilizadas con diferentes crioprotectores, se procedió a realizar una serie de ensayos funcionales con el fin de determinar cuál de los distintos crioprotectores empleados era el óptimo para conservar las características funcionales y morfológicas de dichas EVs^{B16-F10} (tanto vacías como cargadas con ambos tipos de NPs) así como para analizar las posibles diferencias de almacenaje a largo plazo entre crioprotectores. Para ello, se llevaron a cabo experimentos de estabilidad, evaluando las muestras en diferentes tiempos de almacenamiento posteriores a la liofilización, recogido en la **Tabla 3**.

Condición de EVs ^{B16-F10}	TIEMPO ALMACENAMIENTO (DIAS)
Naturales (sin liofilizar)	
Liofilizadas sin crioprotector (control)	2, 7 y 15
Liofilizadas con PVP	
Liofilizadas con Sacarosa	

Tabla 3: Condiciones de las EVs^{b16-f10} con diferentes crioprotectores y los tiempos de almacenamiento.

En este experimento se compararon EVs^{B16-F10} liofilizadas con manitol, trehalosa, sacarosa y PVP (10 mM), frente a un control sin crioprotector (EVs^{B16-F10} disueltas en agua desionizada). Pasados 2, 7 y 15 días de su liofilización las muestras se re-suspendieron en PBS 1x antes de ser analizadas. Además, se utilizaron EVs^{B16-F10} no liofilizadas como referencia. Dichas EVs^{B16-F10} fueron analizadas por TEM, NTA y medición del potencial zeta (descritos anteriormente en el apartado 3.3).

3.7 EVALUACION DE LA INTERNALIZACION Y LA SELECTIVIDAD DE LAS EVS^{B16-F10} LIOFILIZADAS

3.7.1. DETERMINACION DE LA INTERNALIZACION CELULAR

Una vez optimizadas las condiciones de liofilización de las EVs^{B16-F10}, HG-EVs^{B16-F10} y Pt-EVs^{B16-F10}, se evaluó su capacidad de internalización y

vehiculización al interior celular de sus células parentales. Para ello, se empleó la técnica de microscopía confocal.

3.7.1.1 MICROSCOPIA CONFOCAL

En primer lugar, se llevó a cabo un experimento de internalización por microscopía confocal con el objetivo de determinar la capacidad de internalización en las células parentales (B16-F10) de las EVs^{B16-F10} liofilizadas con diferentes crioprotectores y las EVs^{B16-F10} no liofilizadas (control). Este estudio permitió evaluar la cinética de internalización analizando las partículas presentes en el citoplasma de las células durante los siguientes tiempos de incubación: 4, 24 y 48 horas.

Para ello, se sembraron las células B16-F10 sobre un cubreobjetos de 20 mm, previamente dispuesto en una placa de 24 pocillos, a una densidad de 40.000 células por pocillo y se cultivaron durante 24 horas. Pasado este tiempo se añadieron las EVs^{B16-F10} no liofilizadas y liofilizadas, en una cantidad de 10 µg/ pocillo (expresados en proteína total obtenida por BCA) durante 4, 24 y 48 horas. Para poder seguir las EVs^{B16-F10} por microscopía confocal, estas fueron previamente marcadas con la sonda fluorescente Green PKH67 (λ_{ex} : 490 nm y λ_{em} : 502 nm). Para ello se incubaron 3 µL de sonda por cada 1 mL de EVs^{B16-F10} re-suspendidas en PBS 1x durante 30 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, tras el tiempo de incubación, se realizó un ciclo de ultracentrifugación (100.000 g a 4°C durante 2 horas) para eliminar el exceso de sonda libre. Pasadas 4, 24 y 48 horas, las células se lavaron 3 veces con PBS 1x para eliminar las EVs^{B16-F10} no internalizadas, y se fijaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con paraformaldehído (PFA) al 4%. Tras este tiempo de fijación, las células se lavaron de nuevo con PBS 1x y se añadió 1 mL de PBS 1x en cada pocillo para evitar el secado del cubreobjetos y mantenerlo hasta realizar la tinción de las distintas estructuras subcelulares. Una vez fijadas las células se llevó a cabo la tinción fluorescente de diferentes orgánulos celulares. Para ello, en primer lugar se ensambló la cámara húmeda y, seguidamente, se lavaron los cubreobjetos con las células adheridas en su superficie 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 genera poros en la membrana celular, permitiendo la entrada de los fluoróforos al interior de las mismas.

Para marcar los filamentos de actina del citoplasma celular se utilizó faloidina-Alexa546 (λ_{ex} : 556 nm y λ_{em} : 570 nm), diluida en PBS-BSA-saponina a una concentración 1/200, y puesta en contacto con el cubreobjetos contenido las células durante 1 hora en oscuridad en la cámara húmeda. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron con PBS 1x y agua destilada, y se montaron sobre portaobjetos con 5 µL del medio de montaje contenido NucBlue (Hoechst 33342) (λ_{ex} : 350 nm y λ_{em} : 461 nm) para marcar los

núcleos. Finalmente, se dejaron secar los cubreobjetos antes de sellarse. Los fluoróforos empleados para el marcaje del citoplasma como las EVs fueron suministrados por Sigma Aldrich, mientras que para los núcleos se empleó un fluoróforo obtenido de Invitrogen.

Las muestras se visualizaron en un microscopio confocal localizado en el CIBA: microscopio confocal espectral Zeiss LSM 880 con Airyscan utilizando un objetivo de aceite de inmersión 63x/ N.A 1.40. Además, para garantizar la localización de las EVs^{B16-F10} en el interior celular, se realizaron proyecciones ortogonales a partir de las adquisiciones en dirección Z.

A través de los ensayos de estabilidad y de internalización celular, se pudo determinar qué crioprotector ofrecía un mayor grado de protección durante el proceso de liofilización, conservando mejor la funcionalidad biológica así como la estructura de las EVs^{B16-F10}.

3.7.2. ANALISIS DE LA SELECTIVIDAD CELULAR

Tras el análisis de los experimentos de internalización de las EVs^{B16-F10} liofilizadas con diferentes crioprotectores en las células parentales, se procedió a realizar experimentos de selectividad. La selectividad celular de las EVs^{B16-F10}, HG-EVs^{B16-F10} y las Pt-EVs^{B16-F10} se determinó por microscopía confocal y por Espectroscopia de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS).

3.7.2.1 MICROSCOPIA CONFOCAL

En este ensayo se cultivaron en placas de 24 pocillos células B16-F10, las cuales son las células diana, y células NIH-3T3, derivadas de fibroblastos sanos murinos con el fin de comprobar la especificidad de las EVs^{B16-F10} por sus células parentales, así como analizar las posibles diferencias de dicha selectividad en presencia de los diferentes crioprotectores seleccionados. El protocolo experimental fue el mismo que en los ensayos de internalización. Para el marcaje fluorescente de las EVs^{B16-F10}, se utilizó la sonda Red PKH26 (λ_{ex} : 551 nm y λ_{em} : 567 nm) y los filamentos de actina de ambas líneas celulares se marcaron con faloidina-Alexa488 (λ_{ex} : 495 nm y λ_{em} : 518 nm), así como los núcleos con NucBlue (Hoechst 33342) (λ_{ex} : 350 nm y λ_{em} : 461 nm). Estos experimentos también se visualizaron mediante el microscopio confocal mencionado anteriormente. Además, se realizaron por triplicado para establecer una estadística semi-cuantitativa relacionando la intensidad de fluorescencia con la internalización de las EVs^{B16-F10} en las células. Este análisis semi-cuantitativo se realizó utilizando el software Image J.

3.7.2.2 ICP-MS

La técnica de ICP-MS es una técnica altamente sensible capaz de cuantificar los elementos metálicos presentes en una muestra a concentraciones muy bajas. En este Trabajo Fin de Máster, el ICP se utilizó para determinar la presencia de Au y Pt cuando las HG-EVs^{B16-F10} y las Pt-

EVs^{B16-F10}, respectivamente, se ponían en contacto con las diferentes líneas celulares.

En concreto, permite realizar un análisis cuantitativo multi-elemental de metales, metaloides y no metales hasta concentraciones de ng/mL. A través de esta técnica, la muestra en forma líquida es transportada hasta el nebulizador donde se transforma en aerosol, que es conducido a la cámara de ionización por plasma acoplado inductivamente donde se vaporiza, atomiza e ioniza. Finalmente, los iones se separan según su relación masa/carga en un analizador de cuádruplo, siendo contados por un detector de dinodos. Las relaciones masa/carga generan información cualitativa mientras que el conteo de iones a las distintas relaciones masa/carga permiten obtener información cuantitativa de los elementos.

El análisis ICP-MS se realizó en un equipo perteneciente al Servicio de Análisis Químico de la Universidad de Zaragoza. Se trata de un espectrómetro de masas con fuente de ionización plasma (ICP Pekin Elmer dRC-e), equipado con una celda dinámica de reacción para la eliminación de interferencias espectrales, un nebulizador de flujo cruzado y con una cámara de spray Scott Double Pass. Esta técnica se empleó para cuantificar la cantidad de platino (Pt) y oro (Au) presentes en el interior de las EVs^{B16-F10}. Por ello, en primer lugar se llevó a cabo la siembra de células B16-F10 y NIH-3T3 en placas de 6 pocillos y se mantuvieron en cultivo durante 24 horas en condiciones estándar. Pasado este tiempo, se añadió en cada pocillo 1 mL de medio DMEM completo conteniendo 25 µg de Pt-EVs^{B16-F10} o HG-EVs^{B16-F10}, en sus versiones liofilizadas o no liofilizadas, y en presencia o ausencia de crioprotectores. Las células se incubaron con las EVs^{B16-F10} durante otras 24 horas. Tras la incubación se procedió a recoger y eliminar el sobrenadante con el fin de desechar aquellas EVs^{B16-F10} cargadas con NPs no internalizadas. Seguidamente se añadió 500 µL de tripsina en cada pocillo y se incubó durante 5 minutos. A continuación, se recogió la tripsina con las células levantadas y se almacenaron en eppendorfs diferentes, en función del tipo de muestra. También se añadió PBS 1x al pocillo para rescatar todas las células y resuspenderlas en los eppendorfs. Una vez contenidas las muestras en los eppendorfs, se centrifugaron durante 5 minutos a la velocidad máxima (15.000 g) y, seguidamente, el sobrenadante fue desechar por decantación. El pellet de las muestras se digirió con agua regia (AR) ($\text{HNO}_3 + 3\text{HCl}$) al 10%, concretamente las muestras se dirigieron con 200 µL de AR durante 48 horas y, posteriormente, se diluyeron en 9,8 mL de agua miliQ para poder ser analizadas posteriormente mediante la técnica descrita anteriormente.

3.8 EVALUACIÓN DE LA EFICACIA TERAPÉUTICA DE NPs- EVs^{B16-F10} LIOFILIZADAS

Como se ha mencionado previamente, las PEG-HGNPs tienen propiedades de fototerapia para tratar células cancerosas por hipertermia óptica

mientras que las PtNPs pueden ser usadas como herramientas terapéuticas gracias a su potencial de intercalarse en la doble hélice de ADN de las células tumorales. En esta sección se describe la metodología empleada para analizar la eficacia terapéutica de las HG-EVs^{B16-F10} y de las Pt-EVs^{B16-F10} en ensayos de fototerapia, y de citotoxicidad, respectivamente.

3.8.1 ENSAYO DE TERAPIA FOTODINÁMICA (FOTOTERAPIA)

Este tipo de terapia consiste en el empleo de materiales sensibles a la luz de una determinada longitud de onda que, cuando son irradiados, son capaces de mediar la muerte de las células tumorales a través de procesos como la generación de calor mediado por las NPs causando la muerte de estas células por apoptosis o necrosis en función de la frecuencia del pulso, la longitud de onda y el tiempo de exposición al láser.

Debido a la geometría de las PEG-HGNPs encapsuladas en el interior de las EVs^{B16-F10}, estas presentan un espectro de absorción que contiene un pico entre 800 y 820 nm, lo cual las hace idóneas para mediar las terapias basadas en hipertermia óptica.

Para llevar a cabo este ensayo, en primer lugar se sembraron células B16-F10 y NIH-3T3 a una densidad de 4.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos y se dejaron en mantenimiento durante 24 horas. Tras este tiempo, se añadieron 2 µg de HG- EVs^{B16-F10} (expresados en proteína total obtenida por BCA) diluidas en medio DMEM completo fresco. Se estudiaron las siguientes condiciones: células incubadas con 1) HG-EVs^{B16-F10} liofilizadas sin crioprotector, 2) HG- EVs^{B16-F10} liofilizadas con sacarosa y 3) HG- EVs^{B16-F10} sin liofilizar. Además, las células sin tratar se estudiaron como control negativo. Pasadas las 24 horas de incubación con las diferentes EVs^{B16-F10}, se procedió a eliminar el medio de cultivo y se lavó con PBS 1x con el fin de eliminar el exceso de EVs^{B16-F10} no internalizadas. Seguidamente se añadió medio DMEM completo fresco y se irradió cada pocillo por la superficie (sin contacto) utilizando un colimador acoplado a un láser NIR (808 nm) a una potencia de 2,36 W durante 10 minutos tal y como se observa en la **Figura 8**. En cuanto al láser empleado, se trata de un generador láser modelo MDL-H-808/2000 mW de diodo infrarrojo de 808 nm (Changchun New Industries Optoelectronics Technology Co., Ltd, Changchun, China). Como control negativo, las células incubadas con los diferentes tipos de EVs^{B16-F10} fueron analizadas en ausencia de irradiación con láser NIR.

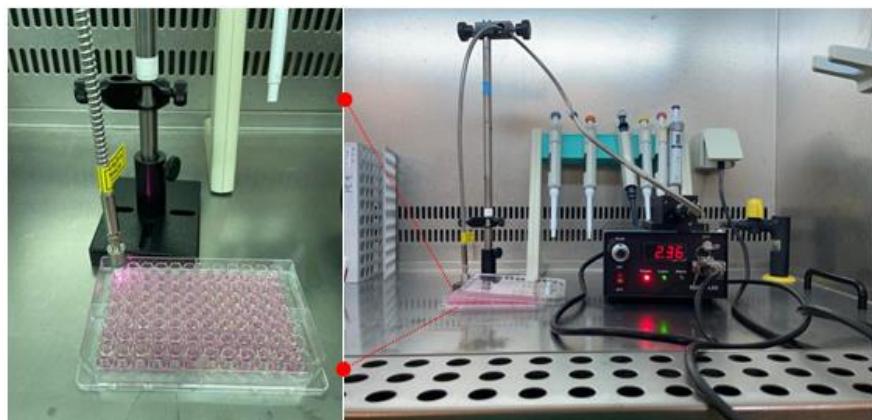


Figura 8: Montaje experimental del láser en condiciones estériles para irradiar los cultivos celulares.

Mientras las células eran irradiadas con el láser, también se procedió a recoger los datos de la temperatura superficial en respuesta a la absorción y dispersión de la radiación NIR por parte de las HG-EVs^{B16-F10} mediante un termómetro digital.

Finalmente, para analizar la muerte celular mediada por hipertermia óptica, se realizó de nuevo el ensayo Blue Cell de viabilidad celular descrito en la sección 3.4.1.2

3.8.2 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD DE LAS PtNPs

En el caso de este tipo de NPs, al no presentar SPR, no son óptimas para llevar a cabo el ensayo de terapia anterior; sin embargo, se ha reportado que el platino es un compuesto anticancerígeno de manera que, a través de un ensayo de citotoxicidad, se pudo comprobar por un lado la dosis de concentración a la cual las PtNPs encapsuladas en las EVs^{B16-F10} tienen un efecto terapéutico y, por otro lado, la eficacia del direccionamiento de las Pt-EVs^{B16-F10} hacia las células tumorales diana (B16-F10) y observar las diferencias de la viabilidad celular respecto a la línea de células sanas (NIH-3T3).

Para evaluar la eficacia terapéutica de las Pt-EVs^{B16-F10} se llevó a cabo este ensayo, en primer lugar se realizó la siembra de ambos tipos celulares en placas de 96 pocillos, a una densidad de 4.000 células por pocillo, y se mantuvieron en cultivo durante 24 horas. Pasado este tiempo, se procedió a eliminar el medio y añadir medio DMEM completo fresco el cual contenía, para cada condición, las EVs^{B16-F10} liofilizadas diluidas en él. Las dosis de EVs^{B16-F10} testadas fueron: 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 y 0,0625 µg /mL. La eficacia terapéutica de estas EVs^{B16-F10} se estudió durante 24 horas. Asimismo, células incubadas en ausencia de Pt-EVs^{B16-F10} fueron usadas como control negativo sin tratamiento. Por último, una vez pasados los tiempos anteriores, se procedió a eliminar el medio para descartar aquellas Pt-EVs^{B16-F10} que no hubieran internalizado en las células y se lavaron con PBS 1x. A continuación, se añadió en cada pocillo una disolución de medio DMEM completo fresco con el reactivo

Blue Cell para evaluar la viabilidad de las células siguiendo el procedimiento especificado en la sección 3.4.1.2

3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN DE EVs^{B16-F10} VACIAS PRE- Y POST-LIOFILIZACIÓN

4.1.1 CARACTERIZACIÓN DE EVs^{B16-F10} VACIAS SIN LIOFILIZAR

Para comprobar tanto la morfología como la funcionalidad de las EVs^{B16-F10} aisladas y vacías, es decir sin NPs contenidas en su interior, se caracterizaron a través de diferentes técnicas (anteriormente descritas). En la **Figura 9 A y B** se muestran imágenes obtenidas por TEM que demuestran la morfología redondeada, así como el tamaño de estas EVs^{B16-F10} vacías (en torno a 70 nm-100 nm), las cuales se emplearon como control. La **Figura 9 B**, es una ampliación en la que se puede observar más detalladamente la bicapa lipídica, la cual es característica de estas EVs^{B16-F10} (señalada con una flecha).

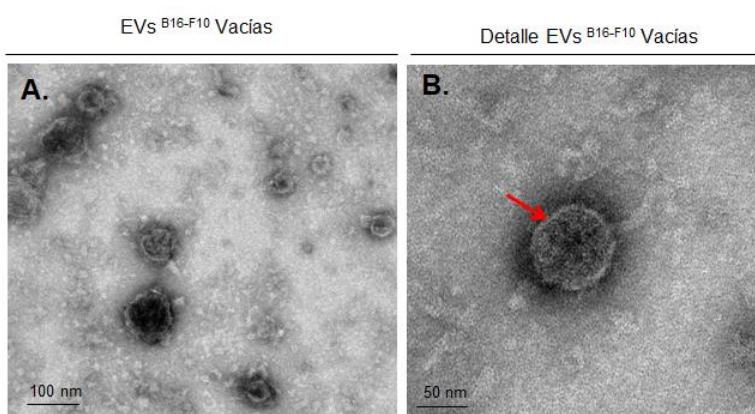


Figura 9. A) Fotografía de TEM de EVs^{B16-F10}. B) Detalle de la bicapa lipídica de estas EVs^{B16-F10}.

El análisis de la carga superficial de estas vesículas a través del potencial zeta mostró un valor de $-19,64 \pm 1,65$ mV. Este potencial negativo es característico de los grupos fosfato presentes en las cabezas polares de la membrana fosfolipídica que rodea a las EVs. La carga superficial negativa

juega un papel relevante en la estabilidad de las EVs en disolución, debido a que las interacciones electrostáticas repulsivas entre las partículas cargadas negativamente ayudan a prevenir su agregación. Por otro lado, el análisis del diámetro hidrodinámico de las EVs^{B16-F10} por medio de la técnica NTA (**Figura 10**) mostró un tamaño medio de $170,4 \pm 81,0$ nm, el cual fue superior al obtenido mediante las fotografías de TEM ya que la técnica NTA proporciona valores correspondientes a la suma del diámetro de la vesícula extracelular junto con una capa eléctrica dipolar adherida a su superficie, conocido como diámetro hidrodinámico.

Los resultados obtenidos tanto de diámetro como de carga superficial de las EVs^{B16-F10} están en concordancia con datos publicados recientemente [38].

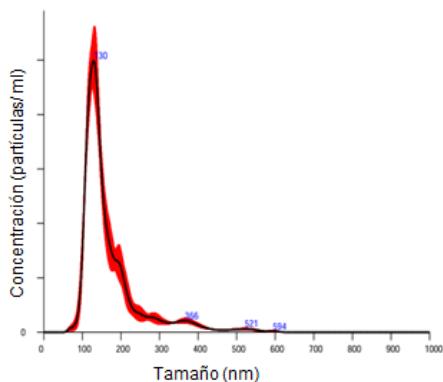


Figura 10: Gráfica de NTA de las EVs ^{B16-F10} vacías.

Además de la caracterización fisicoquímica de las EVs^{B16-F10}, se empleó el kit MACSplex EV (Miltenyi Biotec) descrito anteriormente (apartado 3.3.5) para analizar la expresión de marcadores característicos en la membrana superficial de las EVs mediante citometría de flujo. En la **Figura 11** se muestra los tipos de proteínas y su nivel de expresión en las EVs^{B16-F10}. El kit empleado cuenta con anticuerpos que detectan específicamente la expresión de marcadores clave tales como CD9, CD63 y CD81, los cuales son marcadores descritos en las EVs, de forma que la presencia de expresión de estos confirma que la naturaleza de estas vesículas y no otro tipo de agregados celulares como macromoléculas, ectosomas o cuerpos apoptóticos.

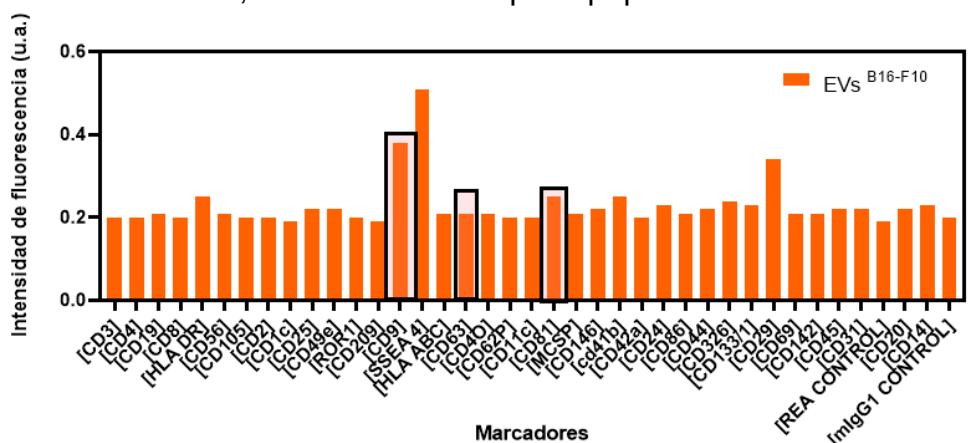


Figura 11: Intensidad de fluorescencia de los diferentes marcadores exosomales medida por citometría de flujo de las EVs^{B16-F10}.

4.1.2 CARACTERIZACIÓN DE EVs^{B16-F10} VACIAS LIOFILIZADAS

Tal y como se ha descrito en la sección de materiales y métodos, tras el análisis de las EVs^{B16-F10} vacías por diferentes técnicas, se procedió a la liofilización de estas con distintos crioprotectores, todos ellos a una concentración de 10 mM.

Los crioprotectores empleados fueron la trehalosa, sacarosa, PVP y manitol. La **Figura 12** muestra EVs^{B16-F10} liofilizadas con los crioprotectores anteriores, mientras que la **Figura 13** muestra las imágenes obtenidas por TEM de las EVs^{B16-F10} liofilizadas con los crioprotectores mencionados, así como en ausencia de crioprotector, esta última se empleó como control. Estos resultados demuestran cómo la presencia de los diferentes crioprotectores es un factor clave en el proceso de liofilización. Por un lado, las EVs^{B16-F10} liofilizadas en ausencia de crioprotectores (**Figura 13 A**) así como en presencia de sacarosa (**Figura 13 B**), PVP (**Figura 13 C**) y trehalosa (**Figura 13 E**) presentaron una morfología redondeada similar a la de las EVs^{B16-F10} no liofilizadas mostradas en la **Figura 9**. Sin embargo, las EVs^{B16-F10} liofilizadas en presencia de manitol presentaban una morfología alterada (**Figura 13 D**).



Figura 12: Muestras de EVs^{B16-F10} liofilizadas ordenadas de izquierda a derecha: control (sin crioprotector), manitol, trehalosa, sacarosa y PVP.

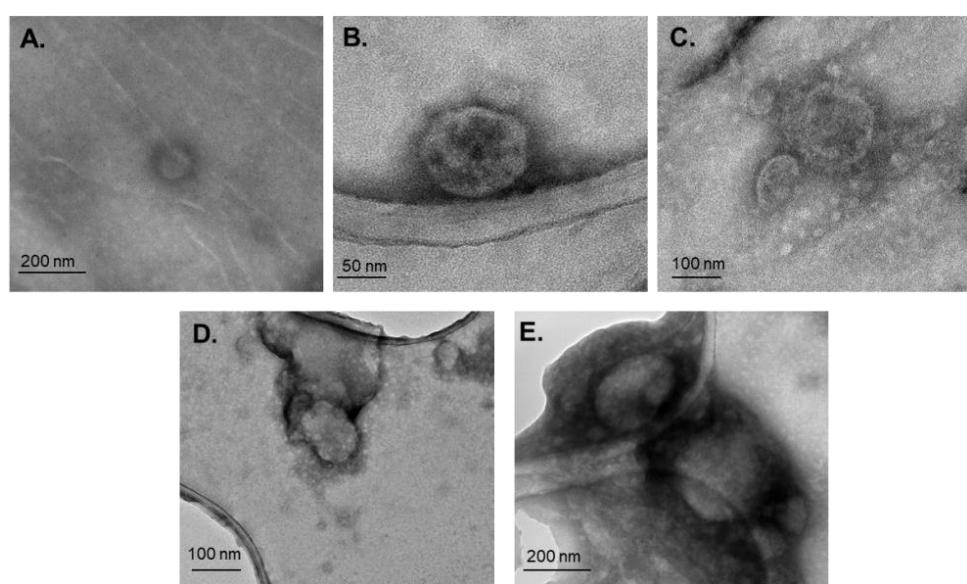


Figura 13: Imágenes TEM de las vesículas liofilizadas. A) EVs^{B16-F10} liofilizadas sin crioprotector B) EVs^{B16-F10} liofilizadas con sacarosa, C) EVs^{B16-F10} liofilizadas con PVP D) EVs^{B16-F10} liofilizadas con Manitol y E) EVs^{B16-F10} liofilizadas con Trehalosa.

Seguidamente se realizó el análisis por NTA del diámetro hidrodinámico de estas vesículas, tal y como se muestra en la **Figura 14**. A través del análisis por NTA se pudo observar que las diferencias de tamaño del diámetro hidrodinámico entre las diferentes EVs^{B16-F10} liofilizadas con distintos crioprotectores no eran suficientemente significativas como para poder descartar alguno de los crioprotectores empleados, ya que el tamaño era similar al de las EVs^{B16-F10} naturales sin liofilizar. Los valores obtenidos, tanto el diámetro hidrodinámico obtenido por NTA así como del potencial zeta, se recogen en la **Tabla 4**.

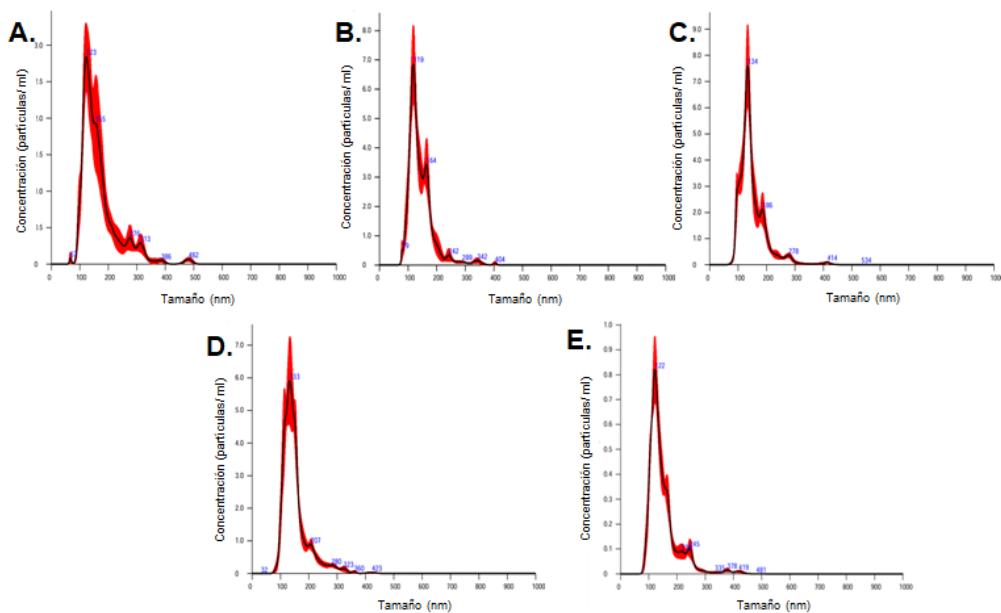


Figura 14: Gráfica de NTA de las EVs^{B16-f10} liofilizadas. A) Sin crioprotector B) con sacarosa C) PVP D) Manitol y E) Trehalosa.

EVs ^{B16-F10}	Diámetro hidrodinámico (nm)	Potencial zeta (mV)
Sin liofilizar	170,4 ± 81,0	-19,64 ± 1,65
Liofilizadas Sin Crioprotector	169,0 ± 66,7	-12,64 ± 0,40
Liofilizadas con Sacarosa	143,5 ± 45,3	-16,98 ± 0,73
Liofilizadas con PVP 10	150,3 ± 49,7	-18,12 ± 0,80
Liofilizadas con Manitol	151,7 ± 47,8	-14,27 ± 0,82
Liofilizadas con Trehalosa	150,5 ± 54,4	-16,50 ± 0'85

Tabla 4: Valores del diámetro hidrodinámico (nm) obtenido por NTA y del potencial zeta (mV) de las EV^{B16-F10} liofilizadas en presencia y ausencia de los crioprotectores seleccionados.

No se observaron diferencias significativas en el tamaño ni en la carga superficial de las EVs con diferentes crioprotectores, de forma que ninguno de ellos alteraba la morfología ni las características fisicoquímicas de las

vesículas. Sin embargo, a pesar de que aparentemente ninguno de los crioprotectores estudiados alteró significativamente las características de las EVs^{B16-F10}, se estableció una primera hipótesis de que los crioprotectores más indicados para conseguir una liofilización óptima de las EVs^{B16-F10} serían tanto la sacarosa como el PVP, ya que mantenían las características, así como una carga superficial más similar al de las EVs^{B16-F10} naturales (sin liofilizar).

Para continuar con el estudio, se utilizó la técnica de FTIR con el fin de analizar los diferentes crioprotectores y su efecto sobre la composición de las EVs^{B16-F10} tras el proceso de liofilización. Se evaluó la presencia de los crioprotectores a través de los enlaces químicos característicos de cada uno de ellos, de modo que también se analizaron los crioprotectores individualmente. Las EVs^{B16-F10} liofilizadas sin crioprotector también fueron estudiadas. Finalmente, se evaluaron las EVs^{B16-F10} liofilizadas en presencia de cada crioprotector, con el objetivo de comparar los perfiles químicos obtenidos. En la **Figura 15** se muestra la representación gráfica del espectro obtenido por esta técnica para cada crioprotector y su comparación con las EVs^{B16-F10} liofilizadas con cada uno de ellos, así como el control de EVs^{B16-F10} liofilizadas en ausencia de crioprotector. Los picos característicos de las EVs^{B16-F10} se resaltan en amarillo, concretamente se identificaron un pico asociado a los grupos metíleno (-CH₂) en el intervalo de 900-1000 cm⁻¹, vibraciones relacionadas con los grupos fosfato en la región de 1000-1300 cm⁻¹, y un pico característico de los grupos amida (I y II) de las proteínas de estas EVs^{B16-F10} en el rango de 1600-1700 cm⁻¹.

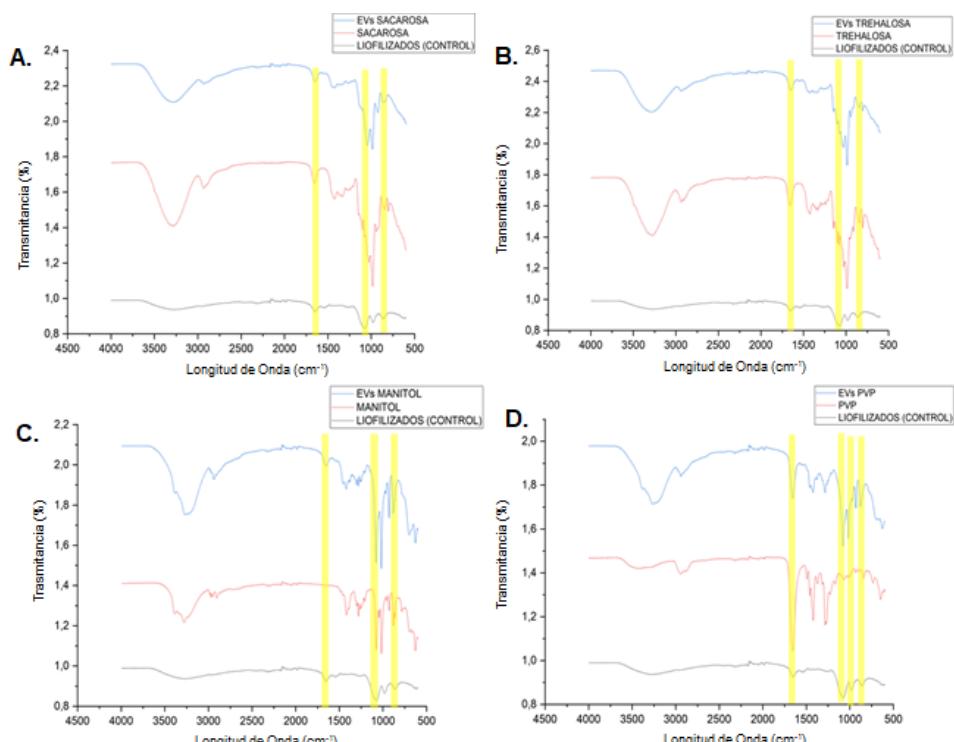


Figura 15: Espectros FTIR de los crioprotectores A) sacarosa B) trehalosa C) manitol y D) PVP, así como de las EVs^{B16-F10} liofilizadas con cada uno de ellos y su comparación con el espectro de las EVs^{B16-F10} liofilizadas sin ningún crioprotector (control).

En cuanto a los crioprotectores, en la **Figura 15 A**, se pueden observar los picos característicos de la sacarosa, con señales entre 700-1500 cm⁻¹ asociadas a los enlaces C-O así como a los anillos de glucosa. Por otro lado también se observa un pico relacionado con las vibraciones de los enlaces C-H en el rango de 2500-3000 cm⁻¹ y un pico asociado a los estiramientos de los grupos hidroxilo (-OH) en el rango de 3000 a 3500 cm⁻¹. En la **Figura 15 B**, se observan los espectros asociados a la trehalosa, concretamente en la región de 1000-1200 cm⁻¹ se observan los picos característicos de las vibraciones de los enlaces C-O y C-C, mientras que en la región de 2800-3000 cm⁻¹ corresponde a los enlaces C-H y en la región de 3200-3600 cm⁻¹ las vibraciones de estiramiento de los enlaces O-H. Por otro lado, en la **Figura 15 C**, se observan los relacionados con el manitol, donde destaca un pico en la región de 1000-1250 cm⁻¹ asociado a los enlaces C-O, mientras que en la región de 1300-1400 cm⁻¹ se observa uno relacionado con la vibración de flexión de los enlaces O-H, y un pico relacionado con la vibración de estiramiento de los enlaces O-H de los grupos hidroxilos en la región de 3400-3500 cm⁻¹. Por último, en la **Figura 15 D** se observan los picos asociados al PVP, de modo que en la región de 1500 a 1900 cm⁻¹ se observa un pico relacionado con el anillo pirrolidona (donde se encuentra el átomo de nitrógeno y el grupo carbonilo) así como interacciones de enlaces de hidrógeno, por otro lado, en el rango de 2800 a 3000 cm⁻¹ se encuentran los estiramientos de los enlaces C-H presentes en la cadena polimérica de este compuesto y en el rango de 3000 a 3500 cm⁻¹ se observa el pico asociado al estiramiento de los enlaces O-H. Los resultados de FTIR demuestran cómo, tras la liofilización los picos característicos de las EVs^{B16-F10} se preservaron junto con los de los crioprotectores empleados, manteniendo sus características naturales, de modo que se puede confirmar que la presencia de los crioprotectores no compromete la integridad molecular de las EVs^{B16-F10}.

Por último se llevó a cabo el análisis por citometría de flujo mediante el kit MACSplex EV (Miltenyi Biotec) [37] con el fin de observar diferencias en la expresión de las proteínas presentes en la membrana superficial de las EVs^{B16-F10}, ya que la presencia del crioprotector podía alterar la expresión y con ello la propiedades intrínsecas de targeting y selectividad de las vesículas. En la **Figura 16** se observa el análisis para los diferentes crioprotectores y el control (que corresponde a las EVs^{B16-F10} liofilizadas sin ningún crioprotector), así como también se resalta la expresión de algunas de las proteínas vesiculares características de este tipo de EVs^{B16-F10} como las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81).

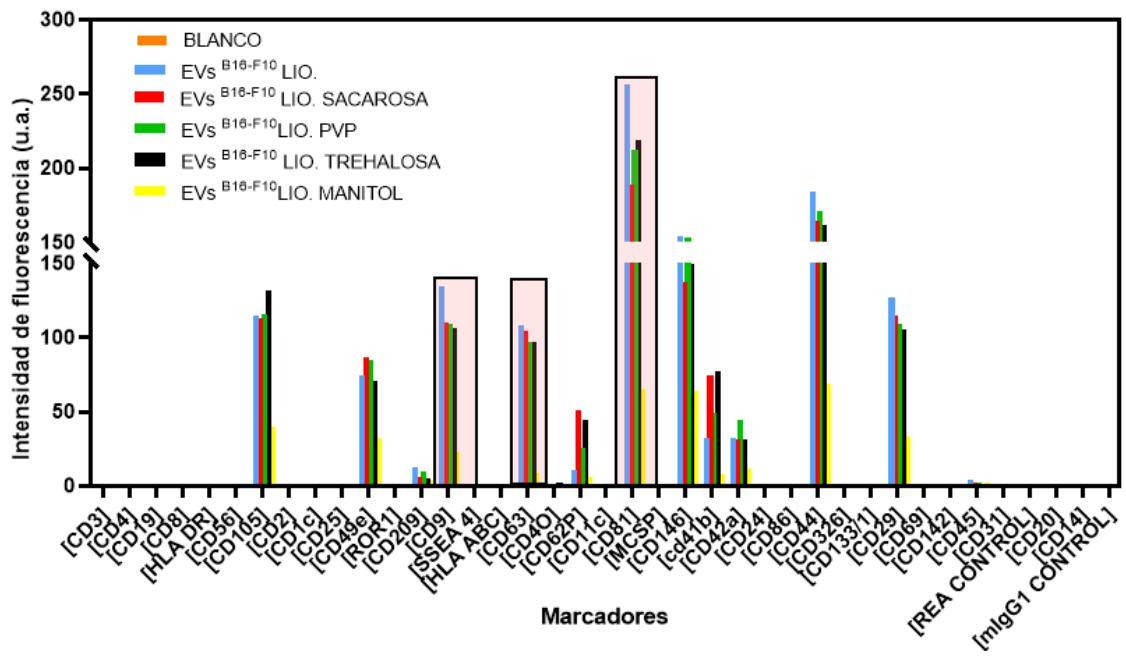


Figura 16: Intensidad de fluorescencia medida por citometría de flujo de las EVs liofilizadas en presencia o no (control) de diferentes crioprotectores.

El análisis de la expresión de los marcadores asociados a EVs^{B16-F10}, realizado por esta última técnica, ayudó a demostrar que los crioprotectores empleados, concretamente la sacarosa, trehalosa y PVP, mantuvieron la expresión de las proteínas exosomales tras la liofilización. Sin embargo, gracias a este análisis, también se observó que las EVs^{B16-F10} liofilizadas en presencia de manitol sufrieron una disminución de la expresión de ciertas proteínas.

Teniendo en cuenta todos los resultados anteriores obtenidos por TEM, NTA y potencial zeta, se pudo concluir que la liofilización de las vesículas con crioprotectores no alteró de manera significativa la morfología ni las características fisicoquímicas de la membrana superficial de las EVs^{B16-F10}, a excepción del manitol. Este crioprotector, al igual que la trehalosa, mostró una capacidad limitada para preservar la integridad estructural de las vesículas. Por otro lado, los crioprotectores sacarosa y PVP mantuvieron la morfología así como la carga superficial de las membranas de las EVs^{B16-F10}, además de la expresión de proteínas exosomales de manera más óptima. Estos resultados coinciden con un estudio [29] en el que se evidenció que el manitol fue el crioprotector menos efectivo para mantener el tamaño medio de las partículas analizadas y, del mismo modo, la trehalosa también mostró una baja eficacia. Además, en esta revisión la sacarosa fue identificada como el crioprotector más eficiente para preservar la estabilidad fisicoquímica de las partículas estudiadas tras la liofilización [39].

Por tanto, considerando todo lo anterior, se seleccionaron únicamente los crioprotectores sacarosa y PVP para los estudios posteriores de carga de NPs, internalización y selectividad celular así como de eficacia terapéutica.

4.2 ENSAYOS EVs^{B16-F10} VACIAS LIOFILIZADAS

4.2.1 ENSAYO ESTABILIDAD

Uno de los objetivos de este trabajo consistió en optimizar la liofilización de las EVs^{B16-F10} con un crioprotector ideal con el fin de poder almacenar estas vesículas a largo plazo sin comprometer la integridad morfológica y funcional de las mismas. Por ello, para poder comprobar la estabilidad, se llevó a cabo el análisis a través de las técnicas de TEM, potencial zeta y NTA en diferentes tiempos, concretamente a los 2, 7 y 15 días posteriores a su liofilización.

Las muestras de EVs^{B16-F10} vacías se liofilizaron en ausencia de crioprotector (control) así como en presencia de sacarosa y PVP, ambos a una concentración de 10 mM como se ha descrito en las secciones anteriores. Además, también se analizaron muestras de EVs^{B16-F10} naturales (sin liofilizar) en los tiempos mencionados anteriormente con el fin de comparar las diferencias que se pudieran observar. Cabe destacar que, tras las 24 horas de liofilización, las muestras se mantuvieron en polvo y se almacenaron a 4°C hasta el momento concreto del análisis. En el momento de analizar las muestras, fueron re-suspendidas en 1 mL de PBS 1x.

Para poder observar las diferencias de estabilidad en los diferentes tiempos, se procedió a analizar los resultados en función de las condiciones de las vesículas, es decir, si estaban (o no) liofilizadas con los diferentes crioprotectores. Por un lado, la **Figura 17 A** representa el análisis por NTA de las EVs^{B16-F10} naturales (sin liofilizar) a diferentes tiempos, mientras que las siguientes figuras muestran las EVs^{B16-F10} liofilizadas en ausencia de crioprotector (**Figura 17 B**), así como en presencia de PVP (**Figura 17 C**) y sacarosa (**Figura 17 D**). La **Tabla 5** recoge los valores de la carga superficial de las mismas por potencial zeta (mV) así como los valores del diámetro hidrodinámico (nm) por NTA.

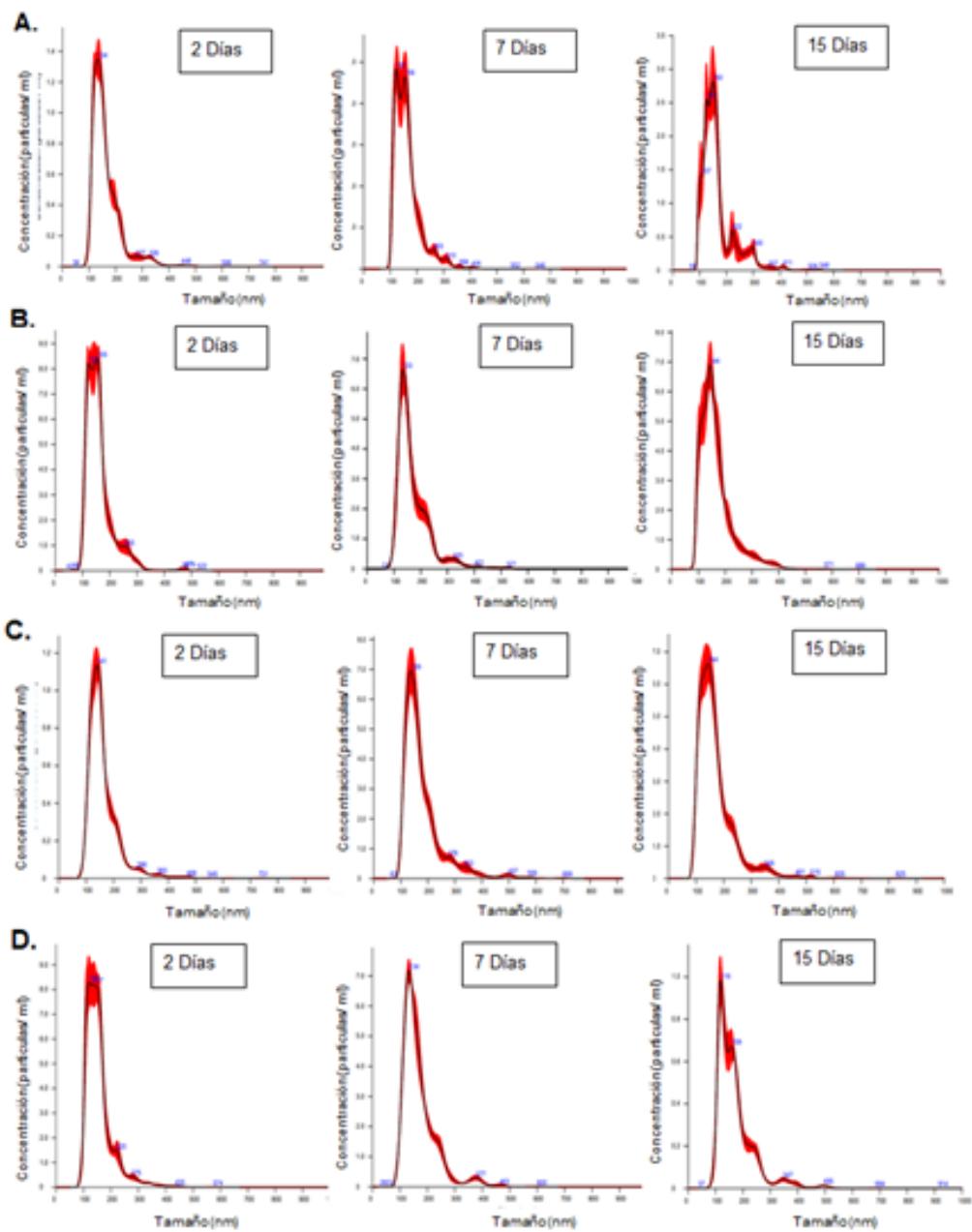


Figura 17: Gráficos de NTA de EVs^{B16-F10} A) naturales (sin liofilizar) B) Liofilizadas sin crioprotector (control) C) Liofilizadas con PVP y D) Liofilizadas con Sacarosa a diferentes tiempos.

EVs ^{B16-F10}	Diámetro Hidrodinámico (nm)			Potencial Zeta (mV)		
TIEMPOS	2 Días	7 Días	15 Días	2 Días	7 Días	15 Días
Naturales (sin liofilizar)	163,9 ± 59,1	163,8 ± 51,3	165,7 ± 63,2	-15,53 ± 1,19	-11,49 ± 2,44	-8,61 ± 1,23
Liofilizadas sin crioprotector (control)	161,0 ± 51,1	171,2 ± 63,0	167,1 ± 65,2	-13,77 ± 2,15	-8,35 ± 1,59	-13,92 ± 0,50
Liofilizadas PVP	161,3 ± 57,1	179,9 ± 77,3	171,5 ± 71,4	-15,38 ± 0,88	-10,90 ± 1,10	-12,24 ± 1,37
Liofilizadas Sacarosa	156,7 ± 51,6	170,1 ± 63,0	170,6 ± 68,7	-15,42 ± 0,93	-14,66 ± 0,68	-8,48 ± 0,92

Tabla 5: Tabla resumen de los diferentes diámetros obtenidos por NTA y los potenciales zeta correspondientes para cada condición de las EVs a diferentes tiempos.

Tal y como se ha expuesto anteriormente en el apartado 3.5, el artículo [28] señala que el almacenamiento de EVs en su estado natural a -80°C conlleva una pérdida progresiva de su funcionalidad biológica, lo cual se puede correlacionar con los resultados mostrados en la **Tabla 5**, ya que se observó una disminución progresiva de la carga superficial negativa de las EVs^{B16-F10} naturales (no liofilizadas) durante el periodo de tiempo estudiado. Esto sugirió la alteración en la estabilidad de la membrana de estas vesículas. Sin embargo, el diámetro hidrodinámico no mostró una variación significativa a lo largo del tiempo, lo que indicó que no hubo una agregación o disgregación de EVs^{B16-F10} relevante.

Por otro lado, las EVs^{B16-F10} sometidas a liofilización, tanto en ausencia como en presencia de crioprotectores, mostraron un aumento del tamaño hidrodinámico al igual que una ligera disminución de la carga superficial negativa aunque menos significativa que en el caso de las EVs^{B16-F10} naturales (no liofilizadas), lo cual sugirió que la liofilización incluso en ausencia de crioprotectores pudo contribuir a la preservación de las propiedades de la membrana. A pesar de estas observaciones, no hubo diferencias suficientemente significativas entre las distintas condiciones de liofilización, de modo que ninguno de los crioprotectores fue mejor en términos de conservación de la carga superficial y del diámetro hidrodinámico de las EVs^{B16-F10}.

Además, también se analizaron las muestras anteriores mediante TEM a los 2 (**Figura 18 A**) y 7 días (**Figura 18 B**) posteriores a la liofilización. En ambas figuras (**Figura 18 A y B**) se muestran tanto las EVs^{B16-F10} naturales (sin liofilizar) (1), así como las EVs^{B16-F10} liofilizadas sin ningún crioprotector (empleadas como control) (2), con PVP (3) y con sacarosa (4).

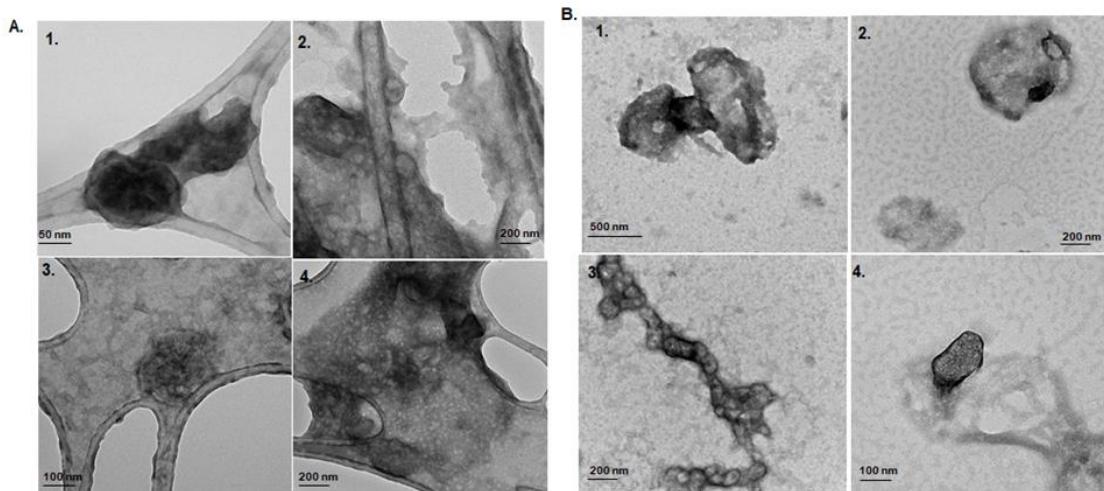


Figura 18: Imágenes obtenidas por TEM de la estabilidad de las EVs^{B16-F10} A) a los 2 días y B) a los 7 días en condiciones naturales (1) y liofilizadas sin crioprotector (2), con PVP (3) y sacarosa (4)

Tras analizar conjuntamente todos los datos anteriores, no se observaron diferencias significativas en cuanto al diámetro hidrodinámico, la

morfología ni la carga superficial negativa de las EVs^{B16-F10} liofilizadas. Por tanto no se pudo descartar ninguno de los dos crioprotectores empleados (sacarosa y PVP), de manera que se decidió mantener el uso de ambos para los posteriores ensayos realizados.

4.2.2 ENSAYO INTERNALIZACIÓN

Una vez seleccionados los crioprotectores que preservaban en mayor medida las características fisicoquímicas de las EVs^{B16-F10} naturales (sin liofilizar) así como la expresión de sus marcadores de membrana característicos se realizaron diferentes estudios de las interacciones de las EVs^{B16-F10} liofilizadas con las células diana en entornos biológicos. Para evaluar si las condiciones de liofilización afectaban la capacidad de las EVs^{B16-F10} para ser captadas por sus células parentales (B16-F10), se realizó un estudio de internalización a distintos tiempos: 4, 24 y 48 horas por microscopía confocal. El objetivo fue evaluar si el proceso de liofilización o si la presencia de ambos protectores seleccionados (sacarosa y PVP) afectaba a la capacidad de internalización natural de estas vesículas en los diferentes tiempos de exposición. La capacidad de internalización se evaluó mediante microscopía confocal. Tal y como se ha descrito anteriormente (apartado 3.7.1.1), las fibras de actina se marcaron con Faloidina Alexa-546 (λ_{ex} : 556 nm y λ_{em} : 570 nm) y los núcleos con NucBlue (Hoechst 33342) (λ_{ex} : 350 nm y λ_{em} : 461 nm), mientras que las EVs^{B16-F10} se marcaron con la sonda Green PKH67 (λ_{ex} : 490 nm y λ_{em} : 502 nm). Las proyecciones ortogonales realizadas a partir de las adquisiciones en dirección Z muestran la internalización de las EVs^{B16-F10} en el citoplasma celular tras 4, 24 y 48 horas. En la **Figura 19** se muestra el estudio de la internalización, a los diferentes tiempos mencionados, de las distintas EVs^{B16-F10} liofilizadas, concretamente se estudiaron las células en ausencia de EVs (denominado control), y en presencia de EVs naturales (EVs^{B16-F10}) así como de EVs liofilizadas sin crioprotector (EVs^{B16-F10} LIO) y con los crioprotectores PVP (EVs^{B16-F10} LIO PVP) y sacarosa (EVs^{B16-F10} LIO SACAROSA). Mientras que en la **Figura 20** aparece el análisis semi-quantitativo de la fluorescencia de las EVs^{B16-F10} en el interior celular en el canal verde (488 nm) a partir de las fotografías de microscopía confocal, el cual indica la cinética de internalización de las EVs^{B16-F10} liofilizadas con los distintos crioprotectores. Como control negativo para descartar la auto-fluorescencia de las propias células, se utilizaron células control sin tratar. Estos resultados demuestran como las EVs^{B16-F10}, las EVs^{B16-F10} liofilizadas sin crioprotector, así como las EVs^{B16-F10} liofilizadas en presencia de sacarosa son internalizadas progresivamente a lo largo del tiempo ya que, pasadas las 48 horas, sigue aumentando el número de EVs^{B16-F10} internalizadas. Por otro lado, las EVs^{B16-F10} liofilizadas con PVP presentaron un máximo de internalización tras las 24 horas. Estos resultados demuestran un comportamiento similar de las EVs^{B16-F10} liofilizadas con sacarosa y las EVs^{B16-F10} naturales, así como también las liofilizadas sin ningún crioprotector.

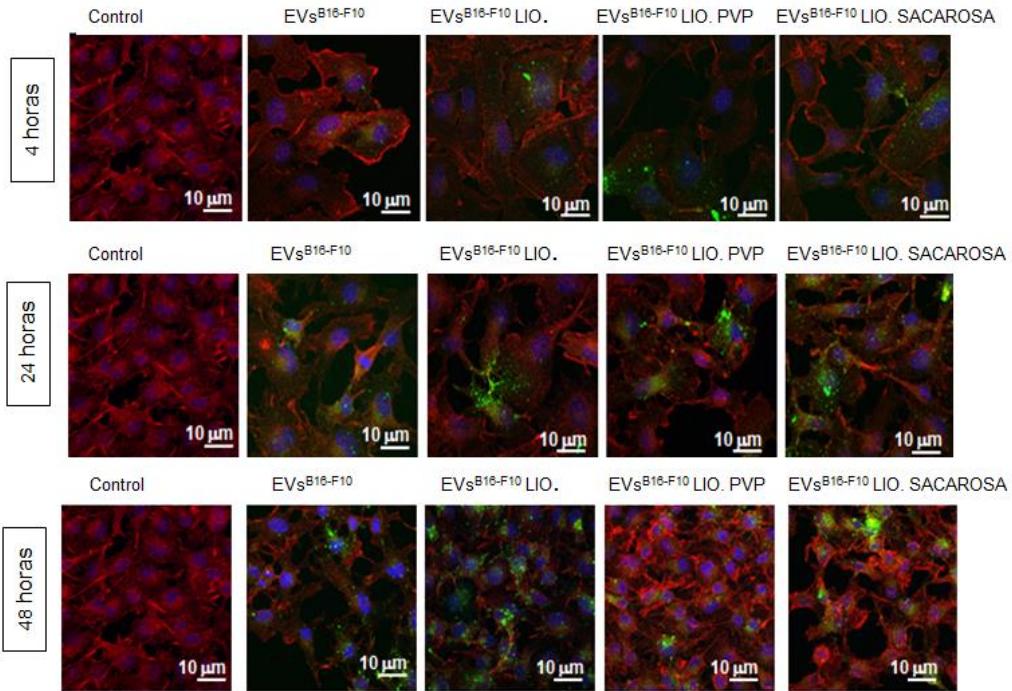


Figura 19: Imágenes de microscopía confocal de células B16-F10 incubadas con EVs^{B16-F10} liofilizadas (o no) con diferentes crioprotectores en diferentes tiempos 4, 24 y 48 horas.

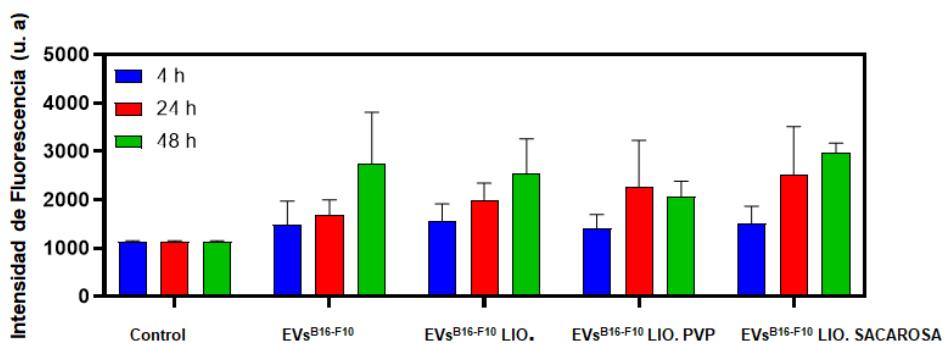


Figura 20: Semi-cuantificación de la señal de las EVs^{B16-F10} de las diferentes imágenes de microscopía confocal presentadas en la **Figura 19**.

4.2.3 ENSAYO DE SELECTIVIDAD

Tras analizar la internalización de las EVs^{B16-F10} en su línea parental bajo distintas condiciones, se procedió a evaluar su especificidad hacia las células de origen B16-F10. Tal y como se detalla en las revisiones [25][35], las EVs presentan capacidad específica hacia sus células parentales debido a la presencia de lípidos, proteínas y otras moléculas derivadas de la célula de origen en su membrana, que actúan como señales de reconocimiento celular, lo cual resulta (tal y como muestran los artículos citados en este párrafo) en una mayor eficiencia de captación de las EVs^{B16-F10} por parte de las células homólogas en comparación con células heterólogas, sugiriendo un mecanismo de tropismo celular mediado por interacciones específicas ligando-receptor.

Por tanto, este ensayo fue clave para comprobar si las EVs^{B16-F10} podían dirigirse de forma preferente a las células diana una vez liofilizadas

(manteniendo su funcionalidad y sus propiedades de direccionamiento), con el fin de optimizar su eficacia terapéutica una vez fueran cargadas con las NPs terapéuticas. Para ello, se diseñó un estudio de selectividad en el que se cultivaron dos líneas celulares: B16-F10 (de las cuales proceden las EVs analizadas), y NIH-3T3 (una línea de fibroblastos sanos murinos utilizada como control off-target). Además, en este estudio se simplificaron los tiempos de observación a las 4 y 24 horas. Esta comparación permitió observar posibles diferencias en la captación de las vesículas y valorar su capacidad de direccionamiento específico hacia su diana celular.

De nuevo, se utilizó la microscopía confocal para evaluar la presencia de las EVs^{B16-F10} en el interior de ambas líneas celulares. Para cada una de las tres réplicas biológicas, las EVs^{B16-F10} utilizadas se obtuvieron de purificaciones independientes. Asimismo, los lotes de liofilización y los procedimientos de marcaje con fluoróforos también fueron distintos en cada réplica. Esta variabilidad controlada garantizó la reproducibilidad de los resultados obtenidos. En la **Figura 21 A y B** se muestra el estudio de la selectividad de las distintas EVs^{B16-F10} para las siguientes condiciones: Control (células que no fueron incubadas con EVs^{B16-F10}), EVs en su estado natural sin liofilizar (EVs^{B16-F10}) y EVs liofilizadas tanto sin crioprotector (EVs^{B16-F10} LIO) como con PVP (EVs^{B16-F10} LIO PVP) y sacarosa (EVs^{B16-F10} LIO SACAROSA). Estas EVs se evaluaron a las 4 y 24 horas para cada línea celular. Los núcleos fueron marcados con NucBlue (Hoechst 33342) (λ_{ex} : 350 nm y λ_{em} : 461 nm), la actina Alexa-488 (λ_{ex} : 495 nm y λ_{em} : 518 nm) y las diferentes EVs^{B16-F10} se marcaron con el fluoróforo Red PKH266L (λ_{ex} : 551 nm y λ_{em} : 567 nm). Mientras que en la **Figura 22** se muestra el análisis estadístico de las 3 réplicas realizadas, el cual permite observar diferencias significativas en la selectividad de estas vesículas entre las dos líneas celulares empleadas. En concreto, se observó como las EVs^{B16-F10} naturales sin liofilizar (EVs^{B16-F10}) internalizaban preferentemente en sus células parentales, particularmente diferencias estadísticamente significativas fueron observadas a las 24 h. Esta misma cinética de internalización en ambas líneas celulares fue observada para las EVs^{B16-F10} liofilizadas en presencia de sacarosa (EVs^{B16-F10} LIO SACAROSA), observándose una internalización más selectiva de las vesículas en sus células parentales a las 24 h. En el caso de las EVs^{B16-F10} liofilizadas sin crioprotector (EVs^{B16-F10} LIO) y en presencia de PVP (EVs^{B16-F10} LIO PVP), a pesar de que se obtuvo una tendencia similar, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas líneas celulares.

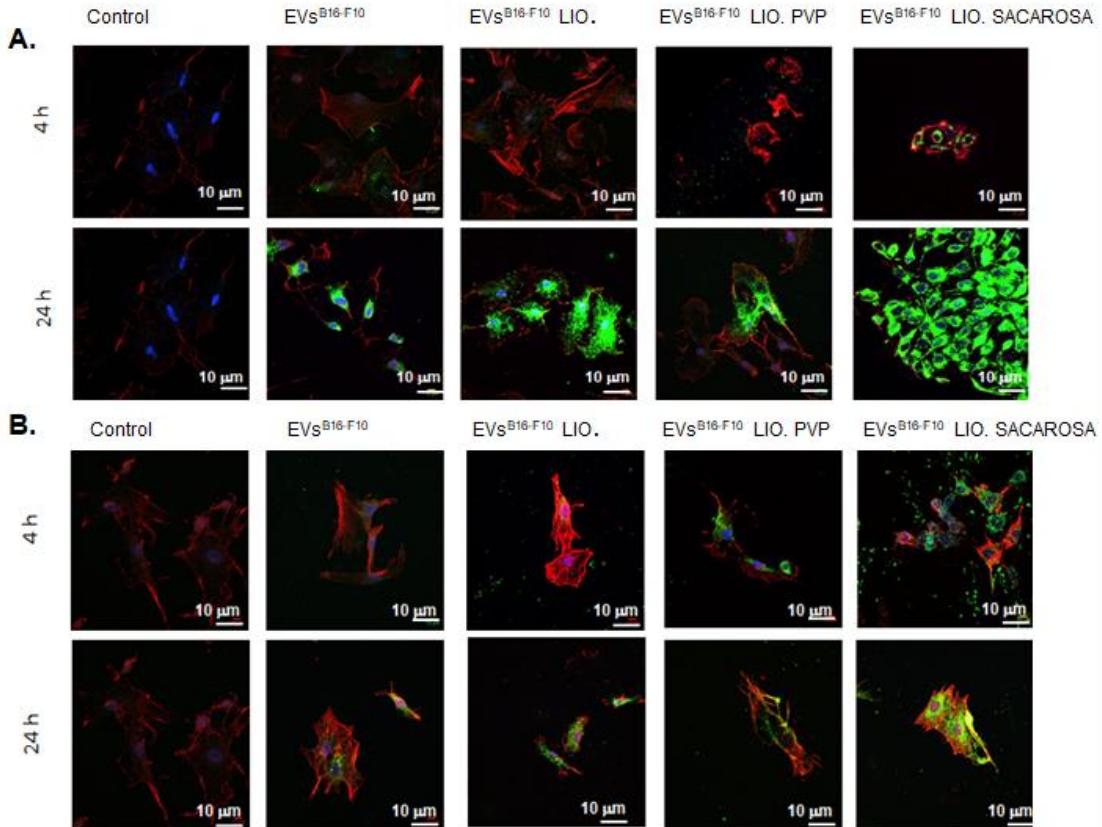


Figura 21: Imágenes de microscopía confocal de células A) B16-F10 y B) NIH-3T3 incubadas con EVs^{B16-F10} naturales (EVsB16-F10) o en ausencia (EVs^{B16-F10}) o presencia de crioprotectores (EVs^{B16-F10} LIO PVP y EVs^{B16-F10} LIO SACAROSA) en diferentes tiempos 4 y 24 horas.

Gracias a este estudio se demostró la especificidad selectiva de las EVs^{B16-F10} por sus células parentales productoras de las vesículas, tal y como se observó en el estudio reportado por Lara et al. (2020) [40]. Además, en el caso de las células B16-F10, se observó una mayor internalización a las 24 horas tanto de las EVs^{B16-F10} liofilizadas con sacarosa (EVs^{B16-F10} LIO SACAROSA) como de las EVs^{B16-F10} naturales (sin liofilizar) (EVs^{B16-F10}) con respecto a las demás condiciones, lo cual indicó que en ambos casos se mantuvieron las propiedades de internalización y targeting de estas vesículas. Del mismo modo, a través de este análisis también se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto a la línea celular sana, lo cual demostró una mayor internalización de las EVs^{B16-F10} en sus células parentales.

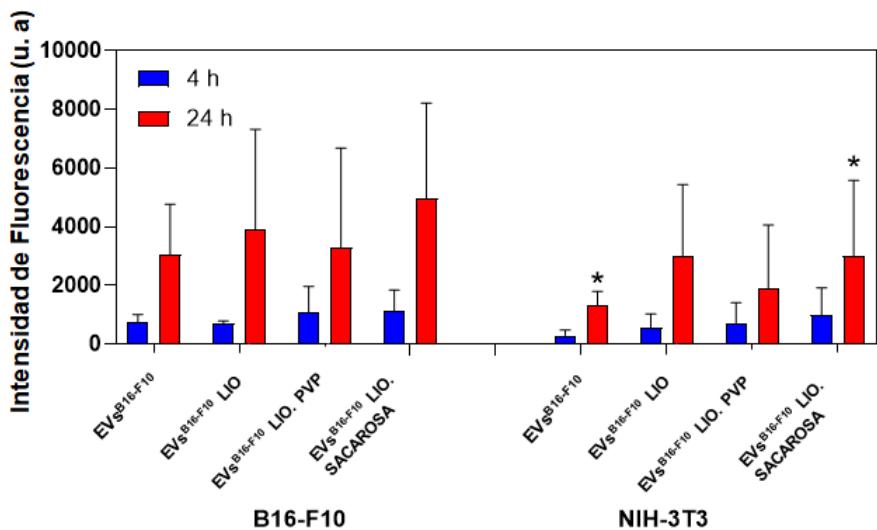


Figura 22: Análisis estadístico del triplicado del estudio de selectividad de las EVs naturales (EVs^{B16-F10}) o en ausencia (EVs^{B16-F10}) o presencia de crioprotectores (EVs^{B16-F10} LIO PVP y EVs^{B16-F10} LIO SACAROSA) en la línea celular parental (B16-F10) y la línea celular control (NIH-3T3).

Considerando los resultados anteriores, y teniendo en cuenta los datos reportados en literatura [29][30], en los que se demostraba que la sacarosa es un agente crioprotector efectivo para mantener el tamaño de las partículas liofilizadas, en este trabajo se seleccionó como el crioprotector más ideal CAR

4.3 CARATERIZACIÓN DE NPs SINTETIZADAS Y NPs-EVs^{B16-F10} LIofilizadas

4.3.1 CARACTERIZACIÓN DE HGNPs SINTETIZADAS

La caracterización de estas HGNPs se realizó a través de las técnicas fisicoquímicas mencionadas anteriormente. Es importante señalar que la caracterización de estas NPs se realizó antes del proceso de pegilación; por ello, en este apartado se hace referencia a las mismas únicamente como HGNPs. En la **Figura 23 A** y **B** se muestran imágenes de las HGNPs obtenidas mediante TEM, en las que se puede apreciar su morfología redondeada. En la síntesis de las HGNPs por reemplazamiento galvánico partiendo de NPs de cobalto empleadas como núcleo sacrificial, se obtuvieron partículas huecas de oro pseudoesféricas. En la **Figura 23 B** puede observarse una fina pared de oro en forma de anillo más oscuro alrededor del núcleo hueco de las HGNPs. Por otro lado, también se estudió la carga superficial de estas NPs, obteniéndose una carga con un valor de $-15,2 \pm 7,1$ mV.

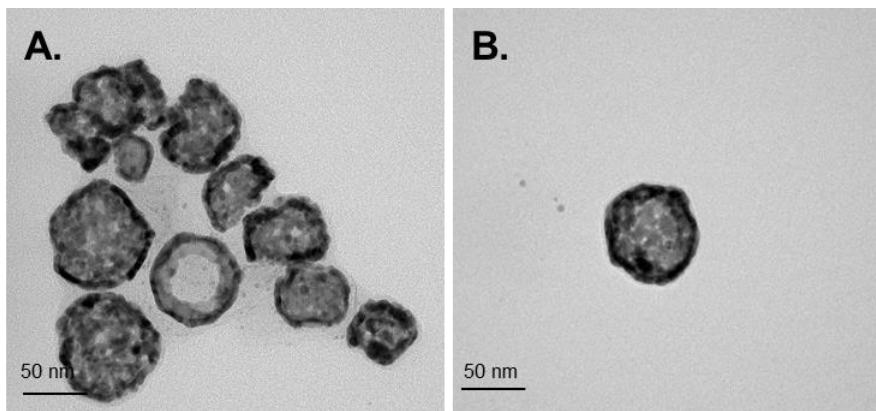


Figura 23. A y B: Fotografías de TEM de las HGNPs sintetizadas.

También se analizaron estas NPs mediante espectroscopia (UV-VIS) de forma que, tal y como se muestra en la **Figura 24**, las HGNPs presentaron un pico máximo de absorbancia en la región NIR, concretamente alrededor de 800 nm. El máximo de absorbancia es debido al fenómeno SPR, que consiste en la oscilación colectiva de los electrones libres 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 [22].

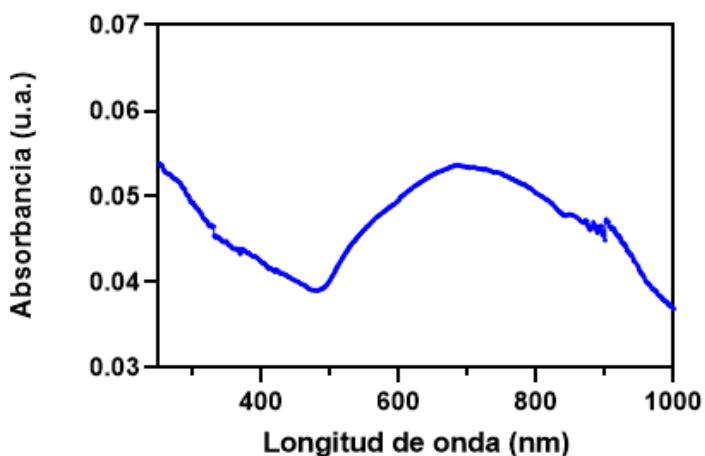


Figura 24: Espectro de absorbancia obtenido por espectroscopia UV-VIS de las partículas desnudas y funcionalizadas con un máximo de absorbancia alrededor de 800 nm.

Para aplicaciones de fototerapia, es importante obtener dispersiones de NPs con un pico máximo de absorbancia en la región NIR, ya que es la zona del espectro donde la luz puede penetrar más profundamente en los tejidos biológicos, posibilitando de esta manera el empleo de estas NPs en aplicaciones de hipertermia óptica. Esto se atribuye al fenómeno *ventana biológica*, el cual es un rango en el que las longitudes de onda del agua y de cromóforos como la hemoglobina y desoxihemoglobina presentan una baja absorbancia [24].

4.3.2 CARACTERRIZACIÓN DE PtNPs SINTETIZADAS y de las Pt-EVs^{B16-F10}

En este caso las PtNPs se sintetizaron en el interior de las EVs^{B16-F10} siguiendo el protocolo definido anteriormente en el cual se emplea CO como agente reductor para generar directamente estas nanoestructuras en el interior de las EVs^{B16-F10}. Con ayuda de la microscopía electrónica, en primer lugar, se observaron las Pt-EVs^{B16-F10}. En primer lugar, pudo observarse como la síntesis de las PtNPs directamente en el interior de las EVs^{B16-F10} no afectó a la morfología de las EVs^{B16-F10} naturales, ya que estas preservaban su morfología esférica y su tamaño característico. A través de las imágenes de TEM convencional mostradas en la **Figura 25 A** no se pudo apreciar directamente las partículas en el interior de las EVs^{B16-F10} debido a su pequeño tamaño. Para ello, las Pt-EVs^{B16-F10} fueron analizadas por microscopía electrónica de campo oscuro de alta resolución (TITAN) mostradas en la **Figura 25** y más en detalle en la **Figura 25 C** y **Figura 25 D**. Se observaron claramente las NPs de aproximadamente entre 1 y 5 nm en el interior de las Pt-EVs^{B16-F10}. El análisis por rayos X de la composición de estas partículas confirmó que se trataba efectivamente de Pt (**Figura 26**).

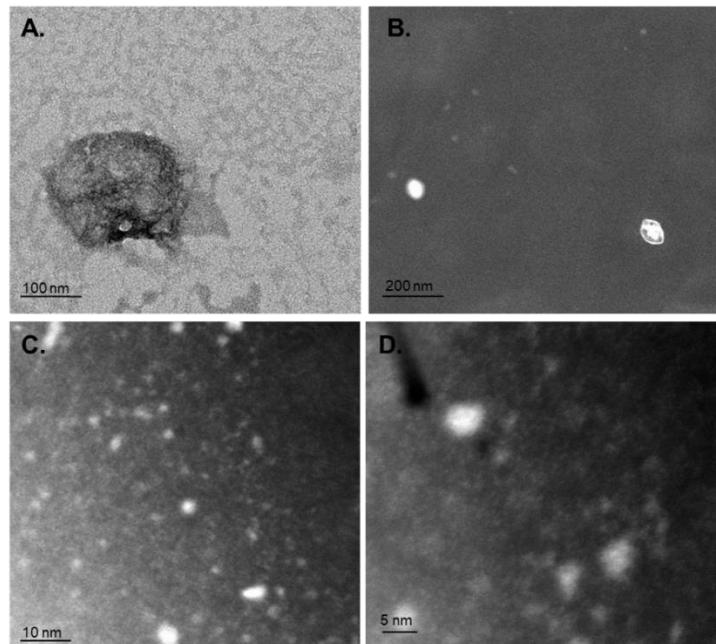


Figura 25: Fotografías por A) TEM y B), C) y D) TITAN de las PtNPs-EVs^{B16-F10}

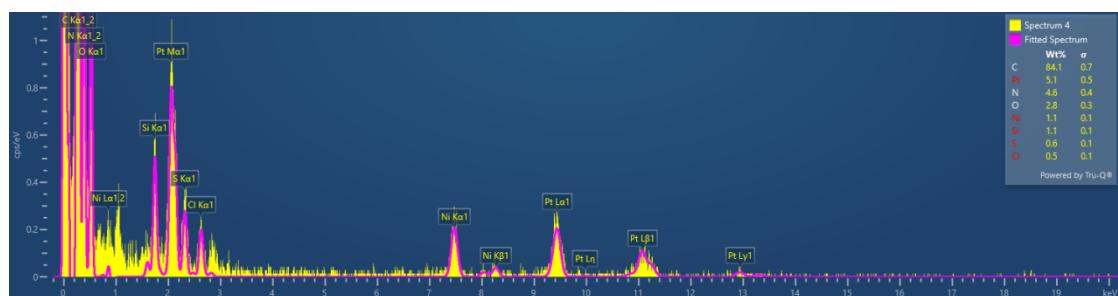


Figura 26: Espectro del análisis por rayos X donde se muestran los componentes de las Pt-EVs^{B16-F10}

Además, estas vesículas también se analizaron por NTA y potencial zeta para comprobar diferencias en la morfología y funcionalidad de las Pt-EVs^{B16-F10} respecto a las EVs^{B16-F10} vacías. En cuanto a las diferencias de diámetro hidrodinámico que se obtuvieron por la técnica del NTA, mostradas en la **Figura 27 A y B** no fueron suficientemente significativas como para poder concluir que la presencia de estas PtNPs afectase al tamaño de las EVs^{B16-F10}. Sumado a lo anterior, el análisis del potencial zeta, mostrado en la **Tabla 6** de estas vesículas tampoco demostró grandes diferencias como para afectar a la funcionalidad de la misma ya que tanto en presencia como en ausencia de las Pt-NPs, las EVs^{B16-F10} presentaban carga negativa, característica de sus membranas.

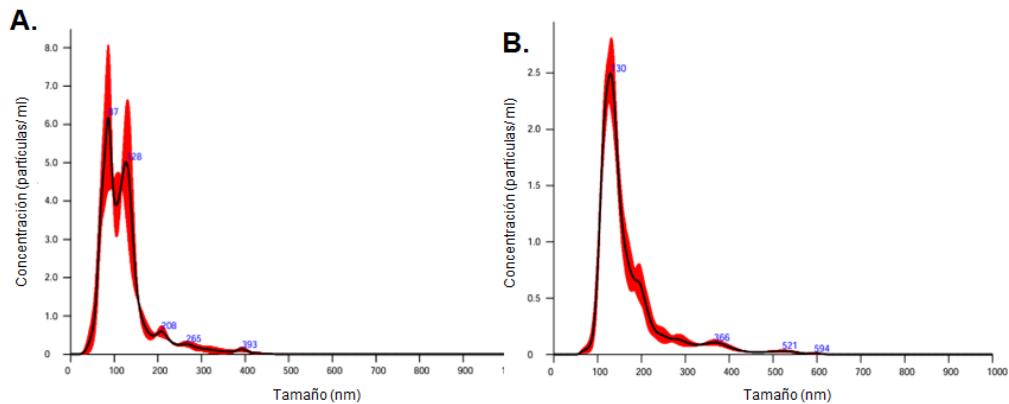


Figura 27: Gráficos de los resultados obtenidos por NTA de A) PtNPs-EVs^{B16-F10} Vs B) EVs^{B16-F10} vacías.

PtNPs-EVs ^{B16-F10}	-9,21 ± 0,99 mV
EVs ^{B16-F10}	-19,64 ± 1,65 mV

Tabla 6: Valores de la carga superficial (potencial zeta) de las Pt- EVs^{B16-F10} Vs EVs^{B16-F10} Vacías.

4.3.3 CARACTERIZACIÓN DE NPs-EVs^{B16-F10} LIOFILIZADAS

Considerando los resultados previos de la caracterización de las EVs^{B16-F10} liofilizadas así como de los estudios de internalización y selectividad de las mismas (descritos en el apartado 4.2.2 y 4.2.3 respectivamente), se concluyó que las condiciones idóneas para liofilizar las EVs^{B16-F10} manteniendo tanto su morfología como su especificidad hacia su línea parental fueron la liofilización en ausencia de crioprotectores así como en presencia de sacarosa. Por lo tanto, estas fueron las condiciones elegidas para liofilizar las EVs^{B16-F10} cargadas con ambos tipos de NPs encapsuladas. De esta manera se procedió al análisis de las HG-EVs^{B16-F10} así como de las Pt- EVs^{B16-F10}.

En primer lugar, se evaluó el diámetro hidrodinámico, por NTA, así como la carga superficial, mediante el potencial zeta, de las EVs^{B16-F10} cargadas con los dos tipos de NPs y liofilizadas con y sin crioprotector (sacarosa). En la

Figura 28 A y B se muestra el análisis por NTA de cada una de ellas para cada condición, mientras que la **Tabla 7** recoge los valores del potencial zeta (mV) y del tamaño hidrodinámico (nm).

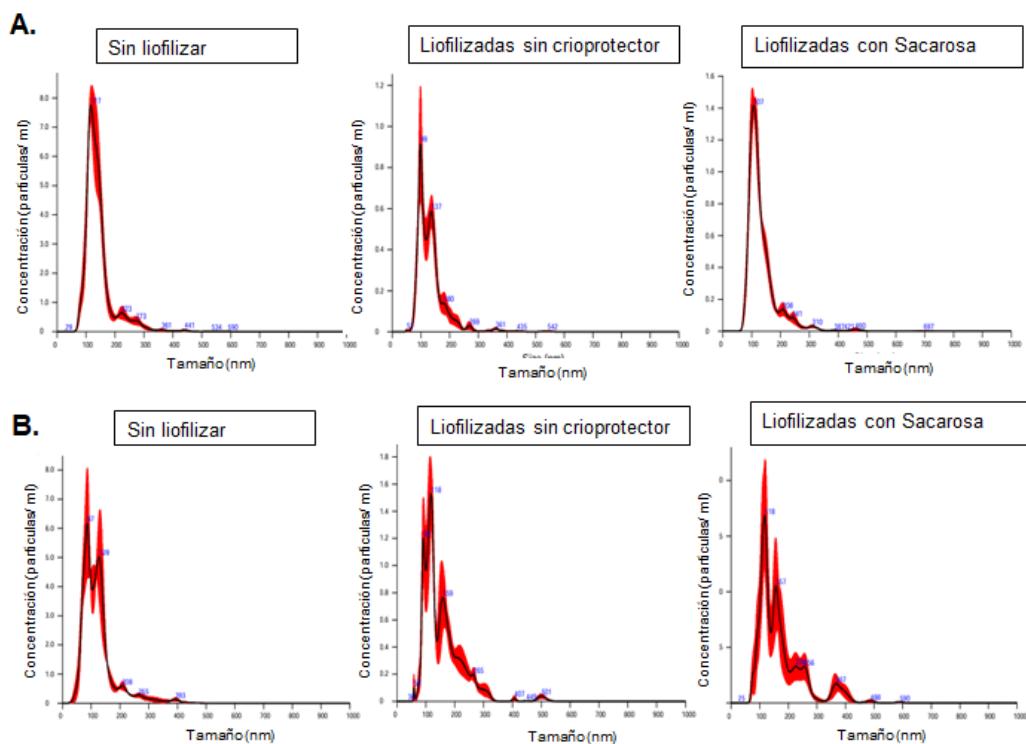


Figura 28: Gráficos de NTA de A) HG- EVs^{B16-F10} y B) Pt- EVs^{B16-F10}.

Los resultados obtenidos por NTA muestran como las HG-EVs^{B16-F10} presentan una mayor estabilidad en cuanto al diámetro hidrodinámico, ya que se observan escasas variaciones entre las distintas condiciones: Sin liofilizar y liofilizadas sin crioprotector o sacarosa. Por otro lado, en el caso de las Pt-EVs^{B16-F10} mostraron más diferencias en los tamaños, tanto entre las diferentes condiciones como en comparación con las HG-EVs^{B16-F10}. En cuanto a la carga superficial, se observó que las EVs^{B16-F10} naturales (sin liofilizar) cargadas con ambos tipos de NPs mostraron un valor de potencial zeta menos negativo en comparación con las EVs^{B16-F10} naturales vacías (analizadas en el apartado 4.1.1), mientras que las EVs^{B16-F10} liofilizadas tanto en ausencia como en presencia del crioprotector (sacarosa) y cargadas con ambos tipos de NPs mostraron una carga superficial negativa similar a la de las EVs^{B16-F10} naturales y vacías. De modo que, a pesar de que la encapsulación de NPs puede producir ciertas alteraciones en las propiedades fisicoquímicas de las EVs^{B16-F10}, estas conservan su naturaleza negativa incluso después de ser liofilizadas.

EVs^{B16-F10}	Diámetro Hidrodinámico (nm)		Potencial Z (mV)	
TIPO DE NPs	PEG-HGNPs	PtNPs	PEG-HGNPs	PtNPs
Sin liofilizar (Naturales)	143,2 ± 52,8	122,9 ± 59,5	-6,68 ± 0,67	-9,21 ± 0,99
Liofilizadas sin crioprotector (control)	134,6 ± 53,7	155,6 ± 69,1	-14,85 ± 1,23	-8,14 ± 1,35
Liofilizadas Sacarosa	135,3 ± 56,4	171,9 ± 80,7	-20,48 ± 1,14	-10,41 ± 3,27

Tabla 7: Tabla resumen de los diferentes diámetros obtenidos por NTA y los potenciales zeta correspondientes para cada condición de las EVs^{B16-F10} cargadas con distintas NPs.

Seguidamente, también se realizó un análisis por citometría de flujo mediante el kit MACSplex EV (Miltenyi Biotec) con el objetivo de determinar si la presencia de las NPs afectaba a la expresión de las proteínas características presentes en la membrana superficial de las EVs^{B16-F10}. En la **Figura 29 A y B** se muestra el nivel de expresión de las proteínas exosomales, las más características se encuentran resaltadas, de las EVs^{B16-F10} cargadas con las NPs (NPs-EVs^{B16-F10}) y en diferentes condiciones nombradas como NPs-EVs^{B16-F10} SIN LIOFILIZAR para las vesículas en su estado natural y para las liofilizadas en ausencia o presencia de crioprotector se nombraron como NPs-EVs^{B16-F10} LIO y NPs- EVs^{B16-F10} LIO SACAROSA, respectivamente. Resaltar que según la NP, se denominó como HG-EVs^{B16-F10} o Pt-EVs^{B16-F10}

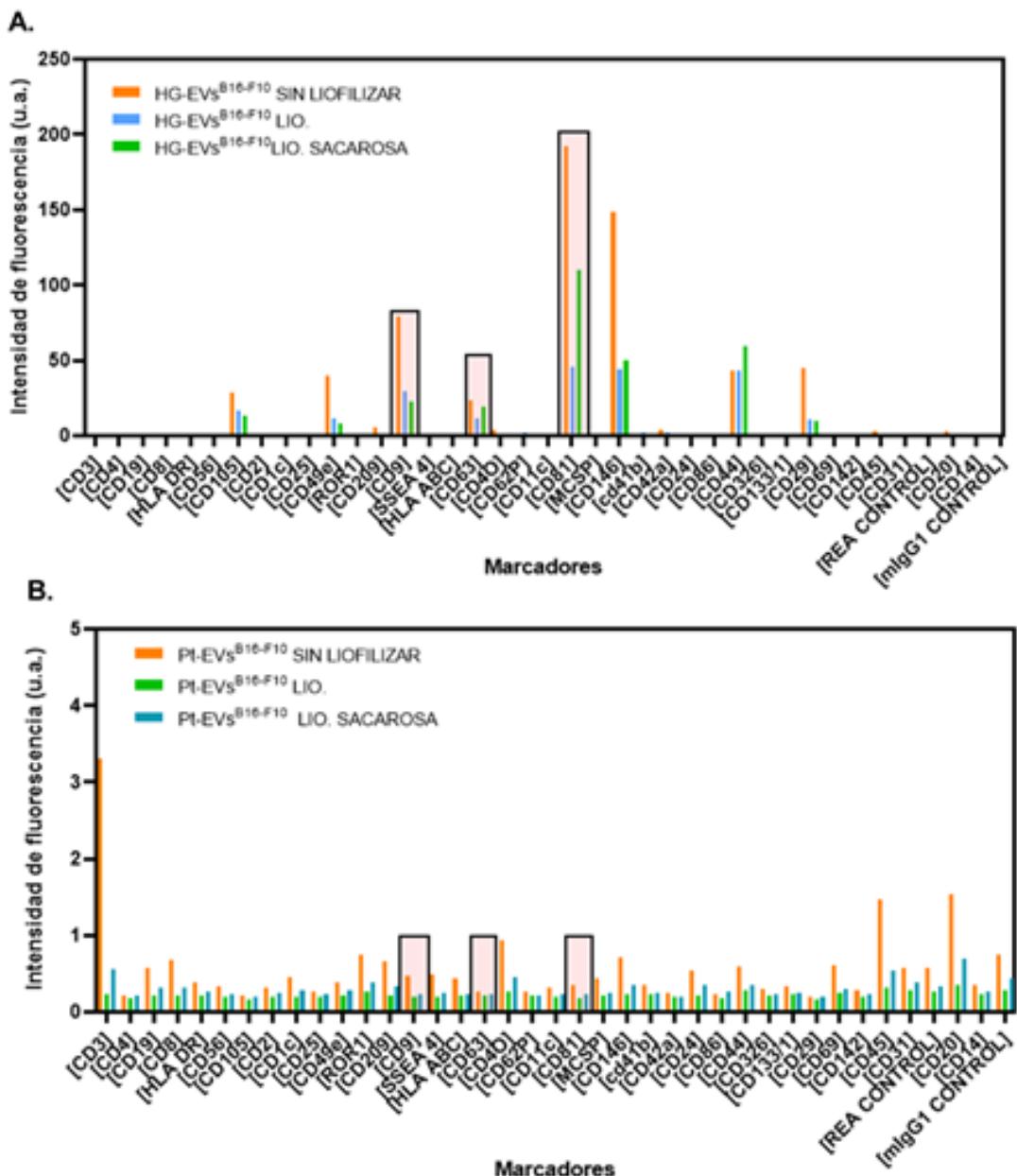


Figura 29: Intensidad de fluorescencia de los diferentes marcadores exosomales medida por citometría de flujo de A) HG- EVs^{B16-f10} y B) Pt- EVs^{B16-f10} en distintas condiciones.

A partir del análisis realizado, se pudo concluir que para ambos tipos de NPs, las NPs-EVs^{B16-F10} liofilizadas en ausencia de crioprotector mostraron una disminución en la expresión de proteínas exosomales en comparación con las NPs- EVs^{B16-F10} no liofilizadas, lo cual podría ser debido a la presencia de las NPs en el interior de las EVs^{B16-F10} cuando son sometidas al proceso de liofilización. Sin embargo, a pesar de esta reducción de la intensidad de expresión de estos marcadores, las NPs-EVs^{B16-F10} liofilizadas tanto en ausencia como en presencia del crioprotector (sacarosa), siguieron expresando los marcadores de vesículas característicos, destacando entre ellos las tetraspaninas CD9, CD81 y CD63. Además, entre las NPs-EVs^{B16-F10} liofilizadas aquellas tratadas con sacarosa conservaron mejor la expresión de estas

proteínas características, en comparación con las liofilizadas sin ningún crioprotector, lo que refuerza el papel protector de este azúcar en la preservación de la integridad proteica durante el proceso de liofilización.

Por otro lado, también se observa una gran diferencia en la intensidad de expresión de los marcadores en función del tipo de NP encapsulada, ya que en el caso de las HG-EVs^{B16-F10} se mantienen semejantes a las EVs^{B16-F10} vacías tanto en presencia como en ausencia de crioprotectores (según lo descrito en el apartado 4.1.2), mientras que en las Pt-EVs^{B16-F10} la intensidad de expresión es notablemente menor. Esta diferencia podría ser debida al método de carga de las NPs empleado, ya que en el caso de las PEG-HGNPs, al ser internalizadas por las células parentales (B16-F10) mediante un proceso de endocitosis, posteriormente son liberadas de manera natural dentro de las EVs^{B16-F10}, conservando de este modo las proteínas características de sus células de origen, mientras que por el otro lado, las PtNPs se sintetizan directamente en el interior de las EVs^{B16-F10} previamente aisladas mediante un proceso de reducción con CO, lo que podría comprometer en cierta medida la composición proteica de la membrana de estas vesículas [38][26].

En conjunto, estos hallazgos permiten concluir que, aunque la incorporación de NPs en el interior de las EVs^{B16-F10} puede afectar a la expresión de proteínas características de estas vesículas, todas ellas siguieron expresando los marcadores característicos, aunque en menor medida. Estos resultados junto con los datos obtenidos de TEM, NTA y potencial zeta para ambos tipos de NPs, nos permitieron concluir que la presencia de las PtNPs y de las PEG-HGNPs en el interior de las EVs^{B16-F10} no tiene un efecto significativamente disruptivo en las vesículas, preservando su morfología, integridad y funcionalidad intrínsecas. Además, tanto el uso de crioprotectores como el método de encapsulación de las NPs juegan un papel determinante en la conservación de las propiedades estructurales y moleculares de las EVs^{B16-F10} durante y después del proceso de liofilización.

4.4 INTERNALIZACION DE LAS NPs- EVs^{B16-F10} LIOFILIZADAS

4.4.1 ANÁLISIS POR ICP-MS

Tal y como se ha explicado en el apartado 3.7.2.2, se utilizó la técnica de ICP-MS para cuantificar con precisión la cantidad de Au y Pt presente en el interior de las células diana (B16-F10) y de las células control (NIH-3T3). Gracias a la presencia de estos metales en el interior de las EVs^{B16-F10}, pudieron usarse como trazadores muy específicos para determinar la selectividad de las EVs^{B16-F10} cargadas con NPs (NPs-EVs^{B16-F10}) en ambas líneas celulares. Los resultados se recogen en las **Figura 30 A y B**, donde se representa gráficamente la cantidad media en ng de cada metal detectado tras la incubación con las células durante 24 horas.

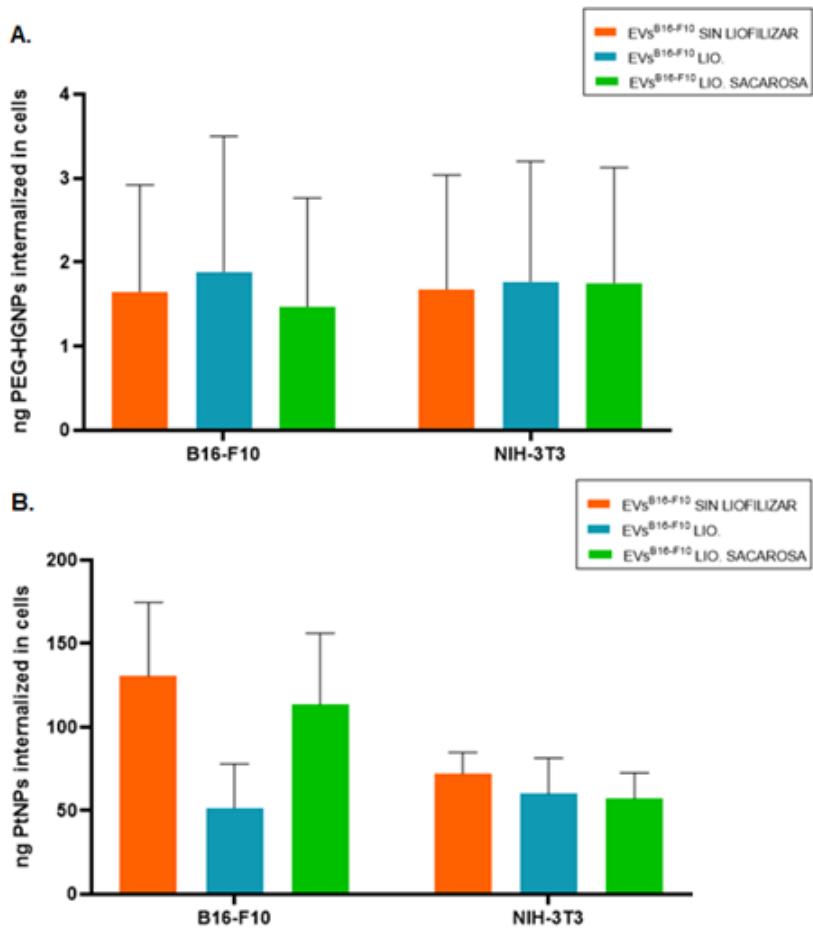


Figura 30: Gráficos de ICP-MS de la cantidad media (ng) de A) Au y B) Pt encapsulado en EVs^{B16-F10} en diferentes condiciones.

En el caso de las células incubadas con las HG-EVs^{B16-F10} (**Figura 30 A**), no se observaron diferencias apreciables en la cantidad de Au internalizado entre las dos líneas celulares, lo que indica que no hubo especificidad celular por parte de las EVs^{B16-F10}. Estos resultados contrastan con los obtenidos en los ensayos previos de selectividad, en los que sí se vio una clara capacidad selectiva de estas EVs^{B16-F10} por sus células parentales. Además, en ambas líneas celulares, la condición que mostró una mayor cantidad intracelular de Au fueron las HG-EVs^{B16-F10} liofilizadas en ausencia de crioprotector. No obstante, se trata de resultados preliminares que serán repetidos y optimizados en el grupo donde se ha realizado este trabajo. Por el contrario, los resultados obtenidos en las células incubadas con las Pt- EVs^{B16-F10} (**Figura 30 B**) fueron más coherentes y compatibles con los obtenidos en la selectividad. En el caso de las células parentales (B16-F10) hubo una mayor internalización de aquellas incubadas con las Pt-EVs^{B16-F10} en su estado natural (sin liofilizar), aunque las Pt-EVs^{B16-F10} liofilizadas con sacarosa mostraron una capacidad de internalización similar a las anteriores, tal y como ocurría en los ensayos de internalización y selectividad (4.2.2 y 4.2.3, respectivamente). Además, en ambas líneas celulares las células que presentaban mayor internalización

fueron aquellas que presentaban las NPs cargadas en EVs^{B16-F10} no liofilizadas (naturales).

En lo que respecta al Au, se observó una menor cantidad de metal internalizado en las células en comparación con las PtNPs. Esta diferencia puede atribuirse, entre otras causas, al tamaño considerablemente mayor de las PEG-HGNPs respecto a las PtNPs, lo cual podría limitar el número de NPs que cada EV puede encapsular. Además, por el método de incubación con células parentales, no se controla la reproducibilidad en el proceso de encapsulación, pudiéndose obtener tanto EVs^{B16-F10} cargadas con varias NPs como NPs vacías. Mediante el novedoso método de reducción por CO y generación *in situ*, logramos controlar muy minuciosamente la carga de las EVs^{B16-F10}, generando vesículas homogéneas con la misma carga de NPs. Por tanto, no sólo el tipo de NPs sino también el proceso de encapsulación de las mismas determinan significativamente su selectividad e interacción en entornos biológicos.

Estos datos refuerzan la hipótesis de que la liofilización con sacarosa permite mantener la eficiencia funcional de las EVs^{B16-F10} como vectores de direccionamiento tumoral, facilitando una mayor entrega intracelular de las NPs terapéuticas, tanto de oro como de platino, y reafirmando su utilidad en aplicaciones oncológicas.

4.4.2 ENSAYO DE LAS HG-EVs^{B16-F10} MEDIANTE FOTOTERAPIA

Tras el análisis de caracterización de las EVs^{B16-F10} liofilizadas y no liofilizadas, al mismo tiempo que cargadas con dos tipos de NPs, se procedió a evaluar el potencial terapéutico de las HG-EVs^{B16-F10} mediante ensayos de fototerapia *in vitro*. El objetivo fue determinar su capacidad para inducir muerte celular mediada por hipertermia óptica, como consecuencia de la irradiación con un láser NIR. En este ensayo, las dos líneas celulares empleadas (B16-F10 y NIH-3T3) fueron incubadas durante 24 horas con 2 µg/mL de HG-EVs^{B16-F10} en diferentes condiciones: sin liofilizar (HG-EVs^{B16-F10}) y liofilizadas en ausencia (HG-EVs^{B16-F10} LIO) o presencia de sacarosa (HG-EVs^{B16-F10} LIO SACAROSA). Además, las células que no fueron incubadas con vesículas fueron empleadas como control negativo.

Para inducir la muerte celular, se empleó un láser de diodo de 808 nm de longitud de onda con una potencia de radiación de 2,36 W, durante un tiempo de 10 minutos. Los resultados se reflejan en la **Figura 31**, donde se muestran los ratios obtenidos al enfrentar, para cada condición, los valores promedio de la viabilidad celular de los cultivos irradiados frente a los no irradiados en ambas líneas celulares.

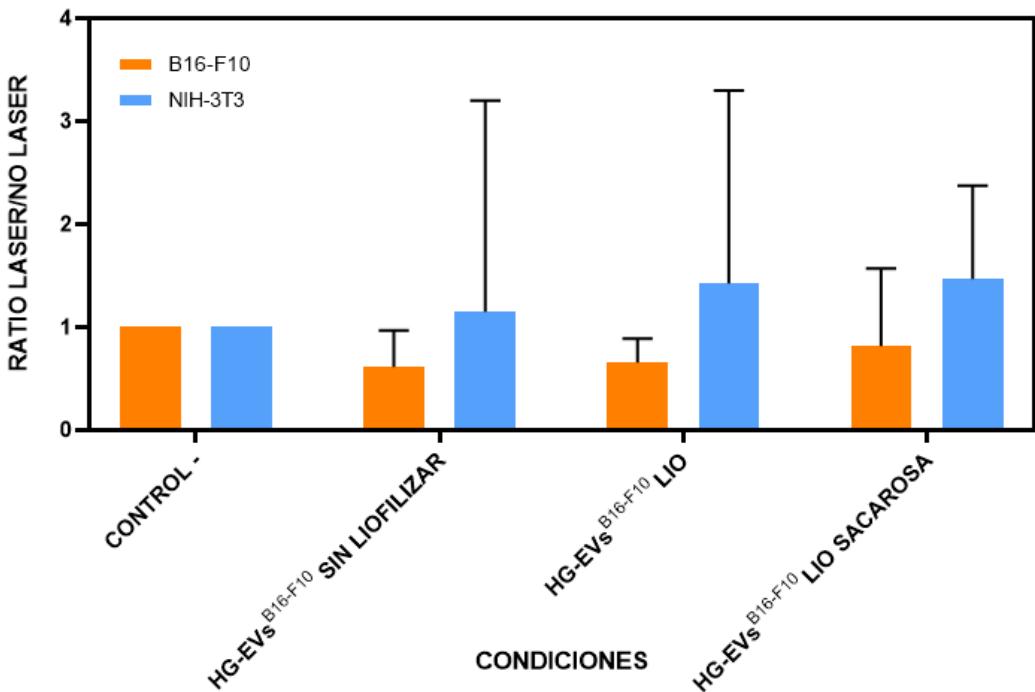


Figura 31: Gráfico de los ratios obtenidos a partir de la irradiación (o no) láser de las células B16-F10 y NIH-3T3 incubadas con las HG-EVs^{B16-F10} durante 24 horas.

Teniendo en cuenta los resultados observados en la **Figura 31**, los valores de ratio inferiores a 1 indican una disminución de la viabilidad celular en presencia de irradiación láser, de modo que la línea tumoral (B16-F10) mostró una mayor muerte celular que la línea celular sana (NIH-3T3) tras la irradiación. Esto demuestra una vez más la capacidad de las EVs^{B16-F10} para dirigirse específicamente a sus células parentales [40]. Sumado a lo anterior, también se observa cómo la condición con las EVs^{B16-F10} naturales produjo mayor muerte celular, en comparación con las EVs^{B16-F10} liofilizadas, por lo que también se demostró una vez más que las condiciones fisiológicas de las EVs^{B16-F10} son las más óptimas. Sin embargo, a pesar de apreciar muerte celular, los valores del ratio se encuentran muy cercanos a 1, lo que indica que la eficacia de la fototerapia, en conjunto, fue baja en ambas líneas celulares. Una posible explicación podría ser la escasa cantidad de PEG-HGNPs internalizadas en las células, tal y como quedó demostrado mediante los análisis cuantitativos realizados por ICP-MS (apartado 4.4.1). Dado que estas NPs tienen un tamaño considerablemente grande, la cantidad de NPs en cada EVs^{B16-F10} es significativamente baja. En consecuencia, la cantidad de Au intracelular es reducida, y esto podría no ser suficiente para generar un aumento térmico significativo tras la irradiación con láser. Además, dado que no tenemos control sobre la producción de las NPs-EVs^{B16-F10} mediante captación natural, existe una población heterogénea incluyendo EVs^{B16-F10} cargadas, NPs sin encapsular y EVs^{B16-F10} vacías. Por tanto, aunque las EVs^{B16-F10} logran dirigirse hacia las células diana y son bien internalizadas, la eficiencia terapéutica del tratamiento fototérmico depende directamente del

contenido de NPs por célula, lo que deberá ser optimizado en futuras investigaciones.

4.4.3 ENSAYO Pt-EVs^{B16-F10} MEDIANTE CITOTOXICIDAD

En el caso de las Pt-EVs^{B16-F10} se llevaron a cabo experimentos de citotoxicidad para evaluar el efecto terapéutico de las Pt-EVs^{B16-F10}. El objetivo de estos ensayos fue analizar la capacidad de estas formulaciones para inducir muerte celular, considerando diferentes condiciones de tratamiento de las EVs^{B16-F10}: liofilizadas vacías, es decir, sin PtNPs en su interior (EVs^{B16-F10}), así como liofilizadas con el crioprotector sacarosa (Pt- EVs^{B16-F10} LIO SACAROSA) o sin él (Pt- EVs^{B16-F10} LIO), además de en su estado natural sin liofilizar (Pt-EVs^{B16-F10} SIN LIOFILIZAR). Las células empleadas, B16-F10 y NIH-3T3, se incubaron con diluciones seriadas de Pt-EVs^{B16-F10}, partiendo de una concentración máxima de 2 µg/mL. Las concentraciones empleadas fueron: 2; 1; 0,5; 0,25; 0'125 y 0'0625 µg/mL. En cuanto al tiempo de incubación, se mantuvo durante 24 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 32**, donde se representan los valores promedio de viabilidad celular en función de la dosis incubada con las células.

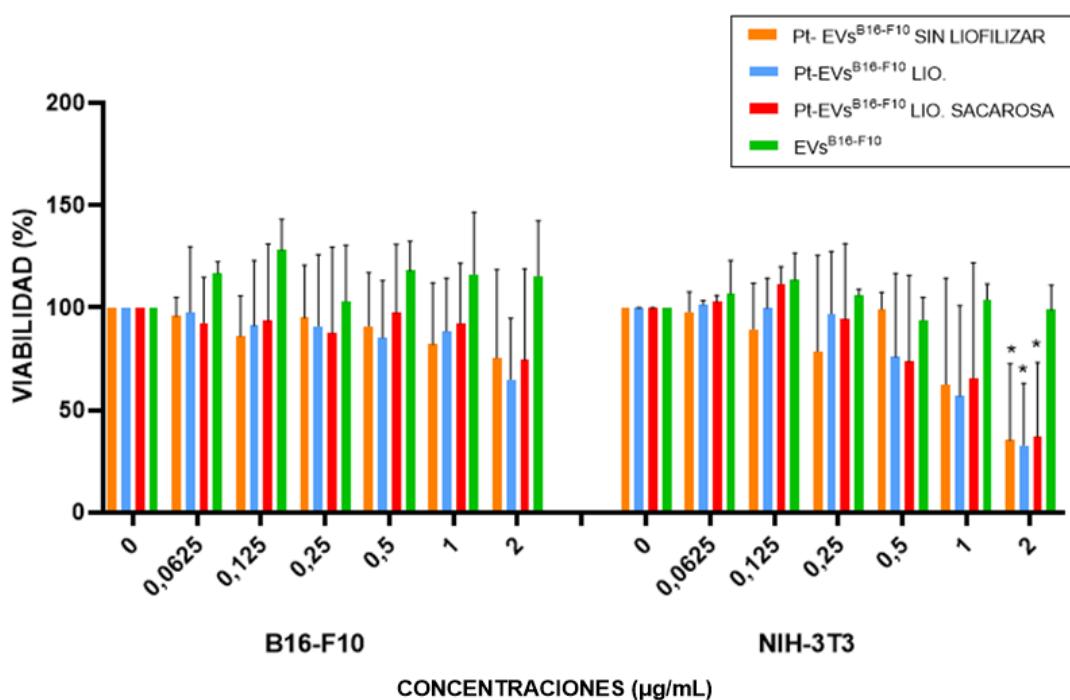


Figura 32: Gráfico de la citotoxicidad mediada por las Pt-EVs^{B16-F10} en diferentes condiciones incubadas con la línea celular tumoral (B16-F10) y sana (NIH-3T3) durante 24 horas.

En primer lugar, se observó como las EVs^{B16-F10} vacías no provocaron ninguna disminución en la viabilidad de las dos líneas celulares, tal y como se esperaba. Por otro lado, en cuanto a las condiciones de Pt-EVs^{B16-F10} tanto en su estado natural (sin liofilizar) como liofilizadas con y sin crioprotector (sacarosa), se observó una reducción progresiva de la viabilidad celular en

ambas líneas celulares, correlacionada con el aumento de la concentración de las EVs^{B16-F10} cargadas con Pt. Sorprendentemente esta disminución fue mucho más pronunciada en el caso de las células no diana (NIH-3T3) comparado con las células diana (B16-F10).

Sin embargo, los resultados obtenidos mediante la técnica de ICP-MS revelaron una mayor cantidad de platino (ng) internalizada en las células tumorales diana. Tomados estos datos conjuntamente, los resultados obtenidos sugirieron que la menor sensibilidad observada en la línea celular diana (B16-F10) pudo deberse a su conocida resistencia intrínseca a los fármacos como el cisplatino y sus derivados, ampliamente documentada en la literatura [13]. De hecho, tratamientos basados en compuestos como el cisplatino han demostrado ser efectivos en otros tipos de cáncer (como el de ovario, pulmón o vejiga), pero presentan baja eficacia en el melanoma debido a diversos mecanismos de evasión celular [6].

En resumen, a pesar de la selectividad de las Pt-EVs^{B16-F10} demostrada anteriormente, los datos obtenidos confirman el efecto citotóxico dosis-dependiente de las Pt-EVs^{B16-F10}, con mayor sensibilidad en células sanas que en células tumorales de melanoma, y ponen de manifiesto las limitaciones del uso de platino en esta línea tumoral, reforzando la necesidad de mejorar su direccionamiento específico o de emplear estrategias terapéuticas combinadas.

5. CONCLUSIONES

En el presente estudio se ha demostrado que las EVs derivadas de células tumorales B16-F10, representan una herramienta prometedora como vehículos naturales para la administración dirigida de NPs metálicas con fines terapéuticos. Los resultados obtenidos a lo largo del trabajo respaldan la viabilidad de esta estrategia en el contexto de la nanomedicina oncológica, al mostrar su capacidad para vehicularizar agentes terapéuticos directamente hacia células tumorales diana y suponen una prueba de concepto inicial para la puesta a punto de liofilización de EVs. Durante la realización del trabajo se fueron alcanzando de forma progresiva los objetivos específicos propuestos en el apartado 2, a través de la realización de ensayos experimentales y técnicas de caracterización. Los resultados obtenidos permiten extraer una serie de conclusiones fundamentales, que se resumen a continuación y se corresponden con las tareas planteadas:

- 1. Sintetizar y caracterizar NPs terapéuticas de diferentes metales:** se logró la síntesis controlada de PEG-HGNPs y PtNPs. Su caracterización mediante diferentes técnicas confirmó sus propiedades morfológicas, tamaño, estabilidad coloidal y comportamiento óptico, validando su uso potencial como terapias antitumorales.

2. **Aislamiento y caracterización de EVs de células tumorales a partir de cultivos celulares:** se consiguió aislar y purificar exitosamente EVs derivados de células B16-F10 mediante ciclos sucesivos de ultracentrifugación. Además, fueron caracterizados a través de métodos fisicoquímicos y biológicos que confirmaron su origen exosomal y su idoneidad como vehículos de entrega de NPs terapéuticas.
3. **Optimizar el proceso de liofilización de las EVs mediante el estudio comparativo del efecto de distintos crioprotectores:** a través de las pruebas fisicoquímicas de las EVs liofilizadas con diferentes crioprotectores, se pudo evaluar cuál de ellos era el óptimo para preservar las características morfológicas y funcionales de las EVs así como mantenerlas almacenadas estables a largo plazo. De todos los crioprotectores testados, la sacarosa demostró ser un potencial crioprotector que permite conservar las EVs del mismo modo que en su estado natural (sin liofilizar).
4. **Encapsular eficientemente las NPs terapéuticas en las EVs aisladas:** se logró encapsular las PtNPs mediante su formación *in situ* dentro de las EVs por reducción con CO, y las PEG-HGNPs a través de la captación celular y posterior aislamiento de las EVs cargadas. Ambas estrategias resultaron funcionales, si bien la eficiencia de encapsulación de las PEG-HGNPs fue limitada, lo que sugiere la necesidad de desarrollar nuevos métodos de carga activa que permitan incrementar la cantidad de Au incorporado por vesícula y así mejorar su efecto terapéutico.
5. **Evaluar la capacidad de internalización y especificidad celular de las EVs cargadas para comprobar su comportamiento diferencial y su potencial como sistemas de direccionamiento selectivo:** la evaluación de estos ensayos por microscopía confocal demostró que las EVs, incluso tras procesos de liofilización, mantuvieron su capacidad de internalización preferente en las células tumorales B16-F10, confirmando su especificidad selectiva por las células de origen. Esto refuerza su utilidad como vectores de direccionamiento selectivo para terapias antitumorales.
6. **Determinar la eficacia terapéutica de los híbridos NPs-EVs en las células tumorales diana:** los resultados de los ensayos de fototerapia pusieron en evidencia la baja eficiencia terapéutica de las HG-EVs^{B16-F10}, atribuible a la escasa carga de Au por vesícula. Por otro lado, los ensayos de citotoxicidad con PtNPs- EVs^{B16-F10} mostraron un efecto dependiente de la dosis en ambas líneas celulares, pero una mayor resistencia de las células de melanoma frente al Pt, en concordancia con la literatura existente sobre la limitada eficacia de quimioterápicos, como el cisplatino, en este tipo de cáncer.

CONCLUSIONS

In the present study, it has been demonstrated that extracellular vesicles (EVs) derived from B16-F10 tumor cells represent a promising tool as natural carriers for the targeted delivery of metallic nanoparticles (NPs) for therapeutic purposes. The results obtained throughout the work support the feasibility of this strategy in the context of oncological nanomedicine, as they show the ability of EVs to deliver therapeutic agents directly to target tumor cells. This serves as a proof of concept for the optimization of EV lyophilization. The specific objectives outlined in Section 2 were progressively achieved through the implementation of experimental assays and characterization techniques. The following key conclusions can be drawn, corresponding to the tasks addressed:

1. **Synthesis and characterization of therapeutic NPs composed of different metals:** Controlled synthesis of PEG-HGNPs and PtNPs was successfully achieved. Their characterization using various techniques confirmed their morphological properties, particle size, colloidal stability, and optical behavior, validating their potential application as antitumor therapies.
2. **Isolation and characterization of EVs from tumor cells via cell culture:** EVs derived from B16-F10 cells were successfully isolated and purified through successive ultracentrifugation cycles. Their exosomal nature and suitability as nanocarriers for therapeutic NPs were confirmed through physicochemical and biological characterization.
3. **Optimization of the EV lyophilization process through a comparative study of different cryoprotectants:** Physicochemical analyses of lyophilized EVs with various cryoprotectants enabled the identification of the most effective compound for preserving both structural and functional properties, as well as ensuring long-term storage stability. Among all cryoprotectants tested, sucrose proved to be the most suitable, maintaining EV characteristics comparable to those of freshly isolated (non-lyophilized) vesicles.
4. **Efficient encapsulation of therapeutic NPs within isolated EVs:** PtNPs were encapsulated via in situ formation inside EVs through CO reduction, while PEG-HGNPs were loaded through cellular uptake followed by isolation of NP-loaded EVs. Both strategies were functional; however, the encapsulation efficiency of PEG-HGNPs was limited, indicating the need for the development of improved active loading methods to enhance gold content per vesicle and thus therapeutic efficacy.
5. **Evaluation of cellular uptake and specificity of loaded EVs to assess differential behavior and potential as targeted delivery systems:** Confocal microscopy analyses confirmed that EVs retained preferential internalization in B16-F10 tumor cells, even after

lyophilization. These findings support the selective tropism of EVs toward their parental cell line, reinforcing their role as promising targeted vectors for cancer therapy.

6. **Determination of the therapeutic efficacy of NP–EV hybrids in target tumor cells:** Photothermal therapy assays revealed low therapeutic efficiency of HG-EVsB16-F10, likely due to limited gold loading per vesicle. Conversely, cytotoxicity assays using PtNPs-EVsB16-F10 showed a dose-dependent response in both cell lines tested, with greater resistance observed in melanoma cells. This finding aligns with existing literature documenting the intrinsic resistance of melanoma to platinum-based chemotherapeutic agents, such as cisplatin.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [2] SEOM, 2023 https://seom.org/images/Las_cifras_del_Cancer_en_Espana_2023.pdf
- [3] https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=cancer&group_populations=1&multiple_populations=1&key=total Cancer today.
- [4] Benito-Martín, A., Jasiulionis, M. G., & García-Silva, S. (2023). Extracellular vesicles and melanoma: New perspectives on tumor microenvironment and metastasis. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1061982>
- [5] Del Real, B. (2024, May 23). Se incrementa la incidencia interanual de melanoma en España con 7.881 casos nuevos en 2024. SEOM: Sociedad Española De Oncología Médica. <https://seom.org/otros-servicios/noticias/210543-se-incrementa-la-incidencia-interanual-de-melanoma-en-espana-con-7-881-casos-nuevos-en-2024>
- [6] Martincorena, I., Raine, K. M., Gerstung, M., Dawson, K. J., Haase, K., van Loo, P., Davies, H., Stratton, M. R., & Campbell, P. J. (2017). Universal Patterns of Selection in Cancer and Somatic Tissues. *Cell*, 171(5), 1029–1041.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.042>
- [7] Mundekkad, D., & Cho, W. C. (2022). Nanoparticles in Clinical Translation for Cancer Therapy. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23031685>
- [8] Chandra Ray, P., Afrin Khan, S., Kumar Singh, A., Senapati, D., & Fan, Z. (2012). Nanomaterials for targeted detection and photothermal killing of bacteria. *Chemical Society Reviews*, 41(8), 3193–3209. <https://doi.org/10.1039/c2cs15340h>
- [9] Vines, J. B., Yoon, J. H., Ryu, N. E., Lim, D. J., & Park, H. (2019). Gold nanoparticles for photothermal cancer therapy. In *Frontiers in Chemistry* (Vol. 7, Issue APR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00167>
- [10] Mironava, T., Simon, M., Rafailovich, M. H., & Rigas, B. (2013). Platinum folate nanoparticles toxicity: Cancer vs. normal cells. *Toxicology in Vitro*, 27(2), 882–889. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.01.005>
- [11] Nejdl, L., Kudr, J., Moullick, A., Hegerova, D., Ruttkay-Nedecky, B., Gumulec, J., Cihalova, K., Smerkova, K., Dostalova, S., Krizkova, S., Novotna, M., Kopel, P., & Adam, V. (2017). Platinum nanoparticles induce damage to DNA and inhibit DNA replication. *PLoS ONE*, 12(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180798>
- [12] Alven, S., Gandidzanwa, S., Ngalo, B., Poswayo, O., Madanhire, T., Aderibigbe, B. A., & Tshentu, Z. (2024). Platinum Group Metals Nanoparticles in Breast Cancer Therapy. *Pharmaceutics*, 16(9), 1162. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16091162>

- [13] Cheon, S. H., Seo, B. Y., Lee, Y. J., Sim, D., Lee, S. B., Guruprasath, P., Singh, T. D., Lee, B. H., Sarangthem, V., & Park, R. W. (2020). Targeting of Cisplatin-Resistant Melanoma Using a Multivalent Ligand Presenting an Elastin-like Polypeptide. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 6(9), 5024–5031. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c00599>
- [14] Benito-Martín, A., Jasulionis, M. G., & García-Silva, S. (2023). Extracellular vesicles and melanoma: New perspectives on tumor microenvironment and metastasis. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1061982>
- [15] György, B., Szabó, T. G., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., László, V., Pállinger, É., Pap, E., Kittel, Á., Nagy, G., Falus, A., & Buzás, E. I. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 68, Issue 16, pp. 2667–2688). <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0689-3>
- [16] Sancho Albero, M., Ramiro, S., Martín Duque, J., & del Pilar, M. (n.d.). *Vehículos híbridos formados por exosomas y nanopartículas. Aplicaciones en terapia y diagnóstico del cáncer.* / María Sancho Albero. <http://zaguan.unizar.es>
- [17] Song, H., Chen, X., Hao, Y., Wang, J., Xie, Q., & Wang, X. (2022). Nanoengineering facilitating the target mission: targeted extracellular vesicles delivery systems design. In *Journal of Nanobiotechnology* (Vol. 20, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01638-9>
- [18] Kluszcynska, K., & Czyz, M. (2023). Extracellular Vesicles-Based Cell-Cell Communication in Melanoma: New Perspectives in Diagnostics and Therapy. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms24020965>
- [19] Trenkenschuh, E., Richter, M., Heinrich, E., Koch, M., Fuhrmann, G., & Friess, W. (2022). Enhancing the Stabilization Potential of Lyophilization for Extracellular Vesicles. *Advanced Healthcare Materials*, 11(5). <https://doi.org/10.1002/adhm.202100538>
- [20] Golan, M. E., & Stice, S. L. (2024). Extracellular vesicle lyophilization for enhanced distribution to the point of care. *Extracellular Vesicle*, 3, 100041. <https://doi.org/10.1016/j.vesic.2024.100041>
- [21] Ahmad, A. (2022). Pharmacological Strategies and Recent Advancement in Nano-Drug Delivery for Targeting Asthma. In *Life* (Vol. 12, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/life12040596>
- [22] Sandra, P. F., Danchen, D., Wheeler, D. A., Newhouse, R., Hensel, J. K., Schwartzberg, A., Wang, L., Zhu, J., Barboza-Flores, M., & Zhang, J. Z. (2011). Highly reproducible synthesis of hollow gold nanospheres with near infrared surface plasmon absorption using PVP as stabilizing agent. *Journal of Materials Chemistry*, 21(7), 2344–2350. <https://doi.org/10.1039/c0jm03690k>
- [23] Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrian, D. J., & Whyman, R. (1994). Synthesis of Thiol-derivatised Gold Nanoparticles in a Two-phase Liquid-Liquid System. In *J. CHEM. SOC., CHEM. COMMUN.*

- [24] Sancho-Albero, M., Sebastian, V., Perez-Lopez, A. M., Martin-Duque, P., Unciti-Broceta, A., & Santamaria, J. (2024). Extracellular Vesicles-Mediated Bio-Orthogonal Catalysis in Growing Tumors. *Cells*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/cells13080691>
- [25] Sancho-Albero, M., Navascués, N., Mendoza, G., Sebastián, V., Arruebo, M., Martín-Duque, P., & Santamaría, J. (2019). Exosome origin determines cell targeting and the transfer of therapeutic nanoparticles towards target cells. *Journal of Nanobiotechnology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0437-z>
- [26] Sebastian, V., Smith, C. D., & Jensen, K. F. (2016). Shape-controlled continuous synthesis of metal nanostructures. *Nanoscale*, 8(14), 7534–7543. <https://doi.org/10.1039/c5nr08531d>
- [27] Lazar, O. A., Nikolov, A. S., Anicai, L., Mihai, G. V., Messina, A. A., Enachescu, M. (2025). Synthesis of Platinum Nanoparticles by Pulsed Laser Ablation with an Excimer KrF Laser in Deep Eutectic Solvents. *American Chemical Society*, 10(8), 8066–8081.
- [28] AboulFotouh, K., Almanza, G., Yu, Y. S., Joyce, R., Davenport, G. J., Cano, C., Williams, R. O., Zanetti, M., & Cui, Z. (2024). Inhalable dry powders of microRNA-laden extracellular vesicles prepared by thin-film freeze-drying. *International Journal of Pharmaceutics*, 651. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123757>
- [29] AboulFotouh, K., Uno, N., Xu, H., Moon, C., Sahakijpijarn, S., Christensen, D. J., Davenport, G. J., Cano, C., Ross, T. M., Williams, R. O., & Cui, Z. (2022). Formulation of dry powders of vaccines containing MF59 or AddaVax by Thin-Film Freeze-Drying: Towards a dry powder universal flu vaccine. *International Journal of Pharmaceutics*, 624. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122021>
- [30] Engstrom, J. D., Lai, E. S., Ludher, B. S., Chen, B., Milner, T. E., Williams, R. O., Kitto, G. B., & Johnston, K. P. (2008). Formation of stable submicron protein particles by thin film freezing. *Pharmaceutical Research*, 25(6), 1334–1346. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9540-4>
- [31] Charoenviriyakul, C., Takahashi, Y., Nishikawa, M., & Takakura, Y. (2018). Preservation of exosomes at room temperature using lyophilization. *International Journal of Pharmaceutics*, 553(1–2), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.10.032>
- [32] Jiang, Y., Hao, M., Jiang, F., Li, J., Yang, K., Li, C., Ma, L., Liu, S., Kou, X., Shi, S., Ding, X., Zhang, X., & Tang, J. (2023). Lyophilized apoptotic vesicle-encapsulated adhesive hydrogel sponge as a rapid hemostat for traumatic hemorrhage in coagulopathy. *Journal of Nanobiotechnology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-023-02128-2>
- [33] el Baradie, K. B. Y., Nouh, M., O'Brien, F., Liu, Y., Fulzele, S., Eroglu, A., & Hamrick, M. W. (2020). Freeze-Dried Extracellular Vesicles From Adipose-Derived Stem Cells Prevent Hypoxia-Induced Muscle Cell Injury. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00181>

- [34] Gharibshahi, E., & Saion, E. (2012). Influence of dose on particle size and optical properties of colloidal platinum nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 14723–14741. <https://doi.org/10.3390/ijms131114723>
- [35] Lorincz, Á. M., Timár, C. I., Marosvári, K. A., Veres, D. S., Otokocsi, L., Kittel, Á., & Ligeti, E. (2014). Effect of storage on physical and functional properties of extracellular vesicles derived from neutrophilic granulocytes. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1). <https://doi.org/10.3402/jev.v3.25465>
- [36] Wu Young Kang, Eun Kyoung Shin, Eun Hee Kim, Min Ho Kang, Chi Young Bang, Oh Young Bang, Jae Min Cha. Lyoprotectant Constituents Suited for Lyophilization and Reconstitution of Stem-Cell-Derived Extracellular Vesicles. *Biomater Res.* 2024;28:0005.DOI:[10.34133/bmr.0005](https://doi.org/10.34133/bmr.0005)
- [37] MACSPlex EV Kit IO, human | Miltenyi Biotec | España. (n.d.). <https://www.miltenyibiotec.com/ES-en/products/macsplex-ev-kit-io-human.html#130-108-813>
- [38] Sancho-Albero, M., Encabo-Berzosa, M. D. M., Beltrán-Visiedo, M., Fernández-Messina, L., Sebastián, V., Sánchez-Madrid, F., Aruebo, M., Santamaría, J., & Martín-Duque, P. (2019). Efficient encapsulation of theranostic nanoparticles in cell-derived exosomes: Leveraging the exosomal biogenesis pathway to obtain hollow gold nanoparticle-hybrids. *Nanoscale*, 11(40), 18825–18836. <https://doi.org/10.1039/c9nr06183e>
- [39] Srinivasan, J. M., Wegiel, L. A., Hardwick, L. M., & Nail, S. L. (2017). The Influence of Mannitol Hemihydrate on the Secondary Drying Dynamics of a Protein Formulation: A Case Study. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106(12), 3583–3590. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.08.018>
- [40] Lara, P., Palma-Florez, S., Salas-Huenuleo, E., Polakovicova, I., Guerrero, S., Lobos-Gonzalez, L., Campos, A., Muñoz, L., Jorquera-Cordero, C., Varas-Godoy, M., Cancino, J., Arias, E., Villegas, J., Cruz, L. J., Albericio, F., Araya, E., Corvalan, A. H., Quest, A. F. G., & Kogan, M. J. (2020). Gold nanoparticle based double-labeling of melanoma extracellular vesicles to determine the specificity of uptake by cells and preferential accumulation in small metastatic lung tumors. *Journal of Nanobiotechnology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-020-0573-0>
- [41] Gibbons, C. H., Vernino, S. A., & Freeman, R. (2008). Combined immunomodulatory therapy in autoimmune autonomic ganglionopathy. *Archives of Neurology*, 65(2), 213–217. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2007.60>
- [42] Buonomo, M., & Warshaw, E. M. (2021). Allergic contact dermatitis due to polyvinylpyrrolidone (PVP)/eicosene copolymer. *Contact Dermatitis*, 85(4), 458–460. <https://doi.org/10.1111/cod.13878>
- [43] Method for generating an inhalable micro-or nanoparticulate aerosol from a dry-powdered biocompatible material, J. Santamaria, M.P. Lobera, B. Arauzo, F. Balas, A. Clemente. Solicitud de Patente española número EP22382574, (2022).

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 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, ExosU251-MG y de los ExosU251-MG cargados con las NPs.



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

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 Op cs 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 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.

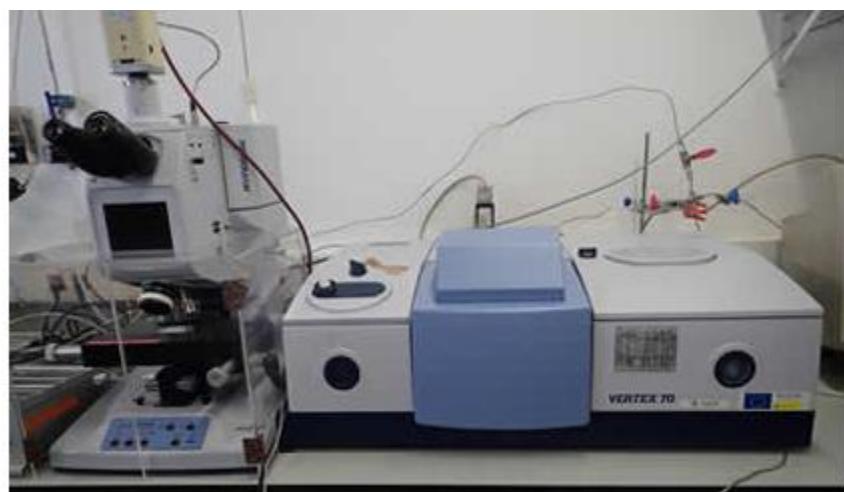


Figura A.2. Espectrómetro Vertex 70 de Bruker Optics equipado con un detector sulfato de triglicina deuterado (DTGS) y un accesorio Golden Gate Diamond. Obtenida de Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA) [5].

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 observan 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 D₂O o de PBS, en función del solvente en el que estaba contenido la muestra.



Figura A.3.Espectrómetro UV-VIS-670 de Jasco. Obtenida de JASCO, Inc.[6]

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 Microscopias 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.4. Microscopio electrónico T20-FEI Tecnai. Obtenida de Laboratorio de Microscopías Avanzadas (LMA) [7].

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 73 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) [8].

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.

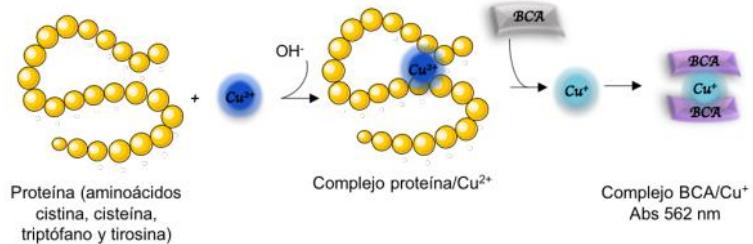


Figura A.5 Esquema general de la reacción que se da en el ensayo BCA para cuantificar la cantidad de proteína total. Adaptada de la tesis doctoral de Sancho, M. [14]

ANÁLISIS DE LA CITOTOXICIDAD METABÓLICA

El ensayo Blue Cell es un ensayo colorimétrico que permite determinar la viabilidad celular midiendo la fluorescencia o absorbancia en función de la actividad metabólica de las células. Se basa en la capacidad de las oxidoreductasas mitocondriales de transformar la resazurina (compuesto azul, no fluorescente y permeable) en resofurina (compuesto fluorescente, ex/em 530/590 nm).

Esta actividad mitocondrial es proporcional a la actividad del metabolismo celular, lo cual permite cuantificar la fluorescencia producida y relacionarla proporcionalmente con la viabilidad celular. Las medidas de fluorescencia se realizaron en un lector de placas Synergy HT (Biotech) [21].

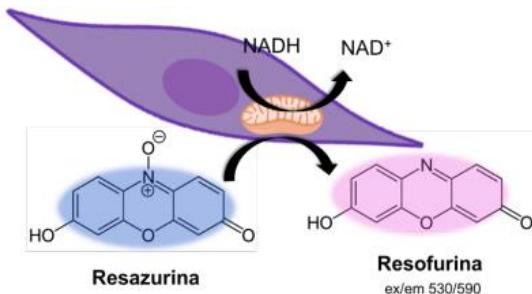


Figura A.6 Reducción de la resazurina (no fluorescente) a resofurina (fluorescente) por las oxidoreductasas mitocondriales. Adaptada de la tesis doctoral de Sancho, M. [14]

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 partículas en la muestra. Se utilizó un equipo Nanosight NS500 (Malvern Panaly cal) para evaluar el tamaño de los exosomas en presencia y en ausencia de NPs en PBS a Ph=7 [9].

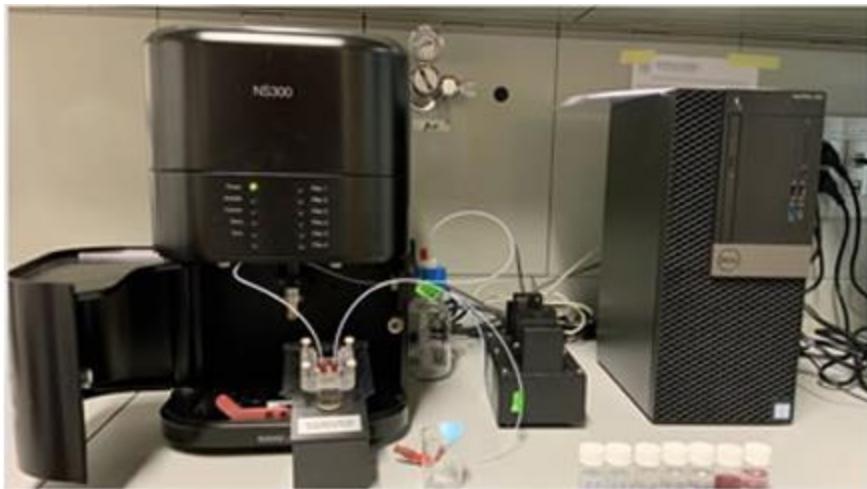


Figura A.7 Equipo Nanosight NS500. Obtenida de Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA) [9].

Análisis multiplex MACSPlex por citometría de flujo

El MACSPlex Exosome Kit permite la detección de 37 epítopos 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 epítopos de superficie. Las 39 poblaciones de microesferas se pueden distinguir por sus intensidades de fluorescencia detectadas por 74 citometría de flujo. En concreto, en este proyecto se utilizó un citómetro analizador Gallios (Beckman Coulter) del IACS localizado en las 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 respec vo epítopo 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 epítopos de superficie diferencia [10].



Figura A.8 Citómetro analizador Gallios (Beckam Coulter). Obtenida de DOTmed [11].

BIBLIOGRAFIA

- [1] *Analizador de partículas por dispersión dinámica de luz (DLS) / MICROTAC.* (n.d.). Microtrac. <https://www.microtrac.com/products/dynamic-light-scattering/>
- [2] *Dispersión de Luz dinámica (DLS).* (n.d.). <https://laboratoriotehnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/dispersin-de-luz-dinamica-dls>
- [3] Sancho Albero, M., Ramiro, S., Martín Duque, J., & del Pilar, M. (n.d.). *Vehículos híbridos formados por exosomas y nanopartículas. Aplicaciones en terapia y diagnóstico del cáncer.* / María Sancho Albero. <http://zaguan.unizar.es>
- [4] *90Plus Brookhaven (Particle Size Analyzer) | ArtisanTGM.* (n.d.). <https://www.artisantg.com/Scientific/58223-6/Brookhaven-90Plus-Particle-Size-Analyzer>
- [5] *Caracterización espectroscópica - Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón.* (2025, March 10). Instituto De Nanociencia Y Materiales De Aragón. <https://inma.unizar-csic.es/investigacion/infraestructura-cientifica-del-inma/caracterizacion-de-materiales/caracterizacion-espectroscopica/>
- [6] Haffner, H. (2024, January 5). *Haze Value Measurement using a UV-Visible Spectrophotometer* | JASCO. JASCO Inc. <https://jascoinc.com/applications/haze-measurement-uvvisible-spectrophotometer/>
- [7] Laboratorio de Microscopías Avanzadas (LMA), “*Tecnai T20*” (2025, January 10). <https://lma.unizar.es/tecnai-t20/>
- [8] Thermo Fisher Scien fic, Pierce BCA Protein Assay Kit.
- [9] *Otras propiedades y técnicas - Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón.* (2025, March 10). Instituto De Nanociencia Y Materiales De Aragón. <https://inma.unizar-csic.es/investigacion/infraestructura-cientifica-del-inma/caracterizacion-de-materiales/otras-propiedades-y-tecnicas/>
- [10] *MACSPlex EV Kit IO, human* | Miltenyi Biotec | España. (n.d.). <https://www.miltenyibiotec.com/ES-en/products/macsplex-ev-kit-io-human.html#130-108-813>
- [11] *Used BECKMAN COULTER Navios Flow Cytometer Un venta de la - DOTmed Listado #2636736:* (n.d.). <https://es.dotmed.com/listing/flow-cytometer/beckman-coulter/navios/2636736>
- [12] Sancho Albero, M., Ramiro, S., Martín Duque, J., & del Pilar, M. (n.d.). *Vehículos híbridos formados por exosomas y nanopartículas. Aplicaciones en terapia y diagnóstico del cáncer.* / María Sancho Albero. <http://zaguan.unizar.es>
- [13] Sancho-Albero, M., Sebastian, V., Perez-Lopez, A. M., Martin-Duque, P., Unciti-Broceta, A., & Santamaria, J. (2024). Extracellular Vesicles-Mediated

Bio-Orthogonal Catalysis in Growing Tumors. *Cells*, 13(8).
<https://doi.org/10.3390/cells13080691>

[14] Sancho Albero, M., Ramiro, S., Martín Duque, J., & del Pilar, M. (n.d.). *Vehículos híbridos formados por exosomas y nanopartículas. Aplicaciones en terapia y diagnóstico del cáncer.* / María Sancho Albero. <http://zaguan.unizar.es>