



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA
LABORATORIO DE NANBIOTECNOLOGÍA**

AISLAMIENTO DE EXOSOMAS CON NANOPARTÍCULAS DE ORO FUNCIONALIZADAS OBTENIDOS DESDE LA LÍNEA CELULAR B16F10.

PATROCINANTE

Dr. Marcelo J. Kogan
Laboratorio de Nanobiotecnología
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas, Universidad de Chile.

DIRECTORES DE MEMORIA

Dr. Marcelo J. Kogan
Laboratorio de
Nanobiotecnología
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas, Universidad de
Chile.

Dr. Andrew Quest
Laboratorio de Comunicaciones
Celulares
Facultad de Medicina Norte,
Universidad de Chile.

Proyecto de Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

SUJEY FERNANDA PALMA FLOREZ

SANTIAGO DE CHILE

2017

*La ignorancia mata a los pueblos,
y es preciso matar la ignorancia.*

José Martí

AGRADECIMIENTOS

Si tuviera que plasmar en palabras toda la gratitud que siento, realmente me faltarían idiomas para poder lograrlo. Honestamente me considero una persona muy afortunada y rodeada de mucho amor, es por esto, que a continuación quiero agradecer.

En primer lugar, agradezco a mi profesor Marcelo Kogan, por darme la oportunidad de estar en su maravilloso laboratorio, guiarme y por sobretodo, creer en mí. Junto con esto, me gustaría agradecer a los profesores de la carrera de Química y Farmacia de la Universidad de Chile, por entregarme conocimiento, herramientas y en varias ocasiones, comprensión.

Por otra parte, no puedo dejar de dar las gracias a quienes me acompañaron la mayor parte de estos años en este loco camino llamado universidad. Sólo recordar esas noches interminables de estudio, poco sueño, mucha comida, muchas risas y una gran contención, las cuales se convirtieron en una hermosa amistad. Muchas gracias Tami, Caro, Cami, Marce, Carla, Nati y muchas otras personas que tuve la oportunidad de conocer aquí. Muchas personas que tuve la suerte de conocer en estos años se llevan una parte de mi corazón Diego, Lito, Mati, Javi, Cami, Jaz, Edidi, Judio, Beto, Aída, Marión, Kato, Kata, Marcos, etc.

Pero sin lugar a duda los grandes gestores de esta memoria son mis inigualables compañeros del laboratorio de nanobiotecnología, el “nanolab”. Muchas gracias chicos por toda su ayuda, paciencia, momentos inolvidables y amistad. Los admiro infinitamente y siempre agradeceré todo lo que me entregaron de manera desinteresada y genuina. Ana, Nati, Pablo, Edison, Sierpe, Pancho, Camilo, Torres, David, Camila, Carla, Pedro, Eduardo, Caro, Vale, Julián, Claudia, Panchito, Aldo, Andreas, Coté, Simón, Yordy y las personas que conocí gracias a uds cómo mi hermosa Marce, Carla, Nico, Ame, Nata, Quintana, entre otros.

Finalmente, quiero dar gracias a los que han estado siempre ahí, mi familia. La vida me ha premiado con varias madres y padres, y estoy muy agradecida por ello. Gracias a Pamela, Juan, Luis y Sussy, por ser mis padres, guiarme, amarme y apoyarme. A mis abuelas Lela y Nona que me dieron una infancia llena de amor. A quien fue un pilar fundamental todos estos años, mi compañero, un incondicional, gracias zafra. A mi tía Caro por amarme desde siempre. A mis primas Camila, Marilia y Vero por siempre darme confianza y su mano cuando lo necesito, a mi primo Franco por ser un orgullo para mí, gracias a todos ustedes por darme unos enanos hermosos que llenan nuestra vida de felicidad.

A todos ustedes y a muchos otros más que fueron, son y serán parte de mi vida, gracias.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Entrega de fármacos.....	3
1.2. Exosomas.....	3
1.2.1. Exosomas derivados de líneas celulares cancerígenas.....	5
1.2.2. Estrategias para cargar exosomas con agentes terapéuticos.....	6
1.3. Nanopartículas de oro.....	7
1.4. Internalización de las nanopartículas de oro en células.....	8
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	12
2.1. Hipótesis.....	12
2.2. Objetivo general.....	12
2.3. Objetivos específicos.....	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
MATERIALES.....	13
3.1. Obtener y caracterizar nanopartículas de oro recubiertas con polietilenglicol (AuNP-PEG) y funcionalizadas con ácido fólico (AuNP-PEG-FA) y R7CLPFFD (AuNP-PEG-R7CLPFFD).....	14
3.1.1. Síntesis de nanopartículas de oro.....	14
3.1.2. Conjugación de AuNP-cit con polietilenglicol y funcionalización con ácido fólico y con el péptido R7CLPFFD.....	14
3.1.3. Caracterización de las AuNP-cit y sus conjugados AuNP-PEG, AuNP-PEG-FA y AuNP-PEG-R7CLPFFD.....	16
3.2. Evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas de oro funcionalizadas en la línea celular B16F10.....	17

3.3. Evaluar <i>in vitro</i> la penetración celular de las nanopartículas de oro funcionalizadas en la línea celular B16F10.....	18
3.3.1. Captación/adherencia por plasmón superficial.....	18
3.3.2. Captación celular por microscopia confocal.....	18
3.3.3. Captación celular por activación neutrónica.....	19
3.4. Aislar y caracterizar exosomas con inclusión de nanopartículas de oro funcionalizadas desde la línea celular B16F10.....	20
3.4.1. Aislar y caracterizar exosomas desde la línea celular B16F10.....	20
3.4.2. Aislar y caracterizar exosomas con inclusión de nanopartículas de oro funcionalizadas desde la línea celular B16F10.....	26
3.5. Evaluar la incorporación de las nanopartículas de oro funcionalizadas en exosomas aislados de la línea celular B16F10.....	29
3.5.1. Espectrofotometría UV-visible.....	29
3.5.2. Activación neutrónica.....	29
3.6. Optimizar el aislamiento de exosomas con inclusión de nanopartículas de oro mediante kit comercial Exospin®.....	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4.1. Obtener y caracterizar nanopartículas de oro recubiertas con polietilenglicol (AuNP-PEG) y funcionalizadas con ácido fólico (AuNP-PEG-FA) y R7CLPFFD (AuNP-PEG-R7CLPFFD).....	32
4.2. Evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas de oro funcionalizadas en la línea celular B16F10.....	36
4.3. Evaluar <i>in vitro</i> la penetración celular de las nanopartículas de oro funcionalizadas en la línea celular B16F10.....	37
4.4. Aislar y caracterizar exosomas con inclusión de nanopartículas de oro funcionalizadas desde la línea celular B16F10.....	41
4.4.1. Aislar y caracterizar exosomas desde la línea celular B16F10.....	41

4.4.2. Aislar y caracterizar exosomas con inclusión de nanopartículas de oro funcionalizadas desde la línea celular B16F10.....	44
4.5. Evaluar la incorporación de las nanopartículas de oro funcionalizadas en los exosomas aislados de la línea celular B16F10.....	47
4.6. Optimizar el aislamiento de exosomas con inclusión de nanopartículas de oro mediante kit comercial Exospin®.....	49
5. CONCLUSIONES.....	55
6. REFERENCIAS.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Biogénesis de exosomas.....	4
Figura 1.2. Estrategias para la inclusión de principios activos en exosomas.....	6
Figura 1.3. Aplicaciones de las nanopartículas de oro en terapia.....	7
Figura 1.4. Efecto fototérmico en nanopartículas de oro.....	8
Figura 1.5. Interacción de las argininas de los péptidos de penetración celular con la membrana celular.....	10
Figura 1.6. Esquema que representa la estrategia de incubación para la incorporación de las AuNPs en exosomas provenientes de las células B16F10.....	11
Figura 3.1. Esquema de la reacción de acoplamiento 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/ N-hidroxisuccinimida (NHS).....	15
Figura 3.2. Esquema resumen para la obtención de exosomas por ultracentrifugación (UC).....	21
Figura 3.3. Esquema resumen para la obtención de exosomas por el kit comercial Exospin®.....	22
Figura 3.4. Esquema del fundamento del kit de cuantificación de proteínas microBCA™.....	24
Figura 3.5. Esquema representativo de la estrategia para la inclusión de nanopartículas de oro en exosomas.....	27
Figura 3.6. Protocolo de obtención de exosomas con AuNPs por (A) Exospin®, y su posterior modificación para optimizar el método de aislamiento (B) Exospin® modificado.....	31
Figura 4.1. Espectro de absorción UV-visible de las AuNP-cit, AuNP-PEG-COOH/OMe, AuNP-PEG-FA y AuNP-PEG-R7CLPFFD.....	33
Figura 4.2. Imágenes de (A) AuNP-cit, (B) AuNP-PEG-COOH/OMe, (C) AuNP-PEG-FA y (D) AuNP-PEG-R7CLPFFD por microscopía electrónica de transmisión.....	36

Figura 4.3. Evaluación de la citotoxicidad de diferentes concentraciones de (A) AuNP-PEG-FA y (B) AuNP-PEG-R7CLPFFD en la línea celular B16F10 a través del ensayo colorimétrico MTS.....	37
Figura 4.4. Evaluación de la captación/adherencia celular de AuNP-PEG-FA y AuNP-PEG-R7CLPFFD 1 nM en células B16F10 a tiempos de incubación de 4 y 6 horas por espectroscopia UV-visible.....	38
Figura 4.5. Evaluación de la captación celular de AuNP-PEG-R7CLPFFD 1 nM en células B16F10 a tiempos de incubación de 2, 6 horas y control por microscopía confocal.....	39
Figura 4.6. Evaluación de la captación celular de AuNP-PEG-FA y AuNP-PEG-R7CLPFFD 1 nM en células B16F10 por análisis de activación neutrónica.....	40
Figura 4.7. Micrografías de exosomas aislados desde la línea celular B16F10 por ultracentrifugación (A) y por Exospin® (B) mediante microscopía electrónica de transmisión.....	43
Figura 4.8. Micrografías de exosomas con AuNPs aislados desde la línea celular B16F10 por ultracentrifugación (A) y por Exospin® (B y C) mediante microscopía electrónica de transmisión.....	46
Figura 4.9. Espectros de absorción UV-visible de exosomas y exosomas con incorporación de AuNPs por (A) Ultracentrifugación y (B) Exospin.....	48
Figura 4.10. Cantidad de oro (ng) por cada 100 µg de proteínas de exosomas con incorporación de AuNPs aislados por ultracentrifugación y Exospin determinada mediante activación neutrónica.....	49
Figura 4.11. Micrografía de exosomas con AuNP-PEG-FA aislados por Exospin® modificado mediante microscopía electrónica de transmisión.....	51
Figura 4.12. Western blotting de exosomas provenientes de células B16F10 con y sin inclusión de AuNPs por diferentes métodos de aislamiento y lisado de células B16F10.....	52
Figura 4.13. Espectros de absorción UV-visible de exosomas con incorporación de (A) AuNP-PEG-FA y (B) AuNP-PEG-R7CLPFFD por Exospin® modificado.....	53

Figura 4.14. Cantidad de oro (ng) por cada 100 μ g de proteínas de exosomas con incorporación de AuNP-PEG-FA ó AuNP-PEG-R7CLPFFD obtenidos por Exospin® modificado.....54

Figura 4.16. Cantidad de oro (ng) por cada 100 μ g de proteínas de exosomas con AuNPs obtenidos por (A) Exospin® vs. Exospin® modificado y (B) Ultracentrifugación vs. Exospin® modificado cuantificada por activación neutrónica.....54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Volúmenes para la preparación de lower gel y upper gel.....	25
Tabla 3.2. Anticuerpos utilizados para western blotting en la caracterización de exosomas provenientes de la línea celular B16F10.....	26
Tabla 4.1. Diámetro hidrodinámico (Dh) promedio e índice de polidispersión (Pdi) de tamaños de AuNP-cit, AuNP-PEG-COOH/OMe, AuNP-PEG-FA y AuNP-PEG-R7CLPFFD por dispersión dinámica de la luz (DLS).....	34
Tabla 4.2. Potencial zeta (mV) de AuNP-cit, AuNP-PEG-COOH/OMe, AuNP-PEG-FA y AuNP-PEG-R7CLPFFD determinado mediante micro electroforesis de láser Doppler (potencial zeta).....	35
Tabla 4.3. Datos tabulados de diámetro hidrodinámico (Dh), índice de polidispersión (Pdi) y carga superficial (pZ) de exosomas aislados por el método de ultracentrifugación y Exospin®.....	42
Tabla 4.4. Datos tabulados de diámetro hidrodinámico (Dh), índice de polidispersión (Pdi) y carga superficial (pZ) de exosomas con incorporación de AuNP-PEG-FA ó AuNP-PEG-R7CLPFFD aislados por el método de ultracentrifugación y Exospin®.....	45
Tabla 4.5. Datos tabulados de diámetro hidrodinámico (Dh), índice de polidispersión (Pdi) y carga superficial (pZ) de exosomas con incorporación de AuNP-PEG-FA ó AuNP-PEG-R7CLPFFD aislados por el método de Exospin® modificado.....	50

ABREVIATURAS

AuNPs	Nanopartículas de oro.
AuNP-cit	Nanopartículas de oro recubiertas con citrato.
AuNP-PEG	Nanopartículas de oro recubiertas con polietilenglicol.
AuNP-PEG-COOH/OMe	Nanopartículas de oro conjugadas con HS-PEG-COOH y HS-PEG-OMe.
AuNP-PEG-FA	Nanopartículas de oro funcionalizadas con polietilenglicol y ácido fólico.
AuNP-PEG-R7CLPFFD	Nanopartículas de oro funcionalizadas con polietilenglicol y el péptido R7CLPFFD.
CCHEN	Comisión Chilena de Energía Nuclear.
CPPs	Péptidos de penetración celular.
DLS	Dispersión dinámica de la luz.
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.
FA	Ácido fólico
FR α	Receptor de folato
miRNA	microRNA
MTS	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxifenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio
MVE	Cuerpos multivesiculares
NHS	N-hidroxisuccinimida.
PEG	Polietilenglicol.
siRNA	<i>small interfering</i> RNA.
HS-PEG-COOH	Polietilenglicol tiolado con terminal carboxilo
HS-PEG-OMe	Polietilenglicol tiolado con terminal metoxi

SPR

Resonancia de plasmón superficial.

STEM

Microscopía electrónica de transmisión.

RESUMEN

Los exosomas son vesículas extracelulares de tamaño nanométrico involucradas en la comunicación celular. El desarrollo de “nanovehículos”, como los exosomas, es una innovadora estrategia para optimizar la entrega de fármacos a un determinado sitio de acción. Por otro lado, las nanopartículas de oro (AuNPs) son candidatos interesantes para su aplicación en biomedicina debido a sus múltiples propiedades fisicoquímicas que le permiten ser empleadas para terapia y diagnóstico. En estudios anteriores se ha observado que los exosomas provenientes de las células B16F10 presentan una acumulación preferente a nivel pulmonar. A partir de esto, estas nanovesículas podrían utilizarse para direccionar de manera selectiva compuestos bioactivos tales como las nanopartículas de oro (AuNPs). Por lo tanto, la hipótesis de este trabajo plantea que es posible aislar exosomas que contienen nanopartículas de oro funcionalizadas a partir del sobrenadante de la línea celular B16F10.

Para llevar a cabo lo anterior, el objetivo de este trabajo fue desarrollar una estrategia para incorporar las AuNPs al interior de los exosomas, y con esto mejorar la entrega terapéutica de éstas. Para esto, se desarrollaron AuNPs conjugadas con ácido fólico o el péptido R7CLPFFD y luego éstas se incubaron con el cultivo celular de B16F10. Posteriormente, se aislaron las nanovesículas por dos métodos: ultracentrifugación y utilizando el *kit* comercial Exospin®. Ambas muestras obtenidas se caracterizaron por *dynamic light scattering*, potencial zeta, microscopía electrónica de transmisión y *western blotting*. Posteriormente, se evaluó la presencia de oro en las muestras de exosomas aislados a través de espectrofotometría UV-visible y activación neutrónica. Como resultado de la estrategia propuesta se obtuvieron exosomas que contienen nanopartículas de oro desde el sobrenadante de la línea celular B16F10. Finalmente, se espera que este nanosistema pueda ser utilizado para la entrega selectiva de principios activos hacia el pulmón.

FINANCIAMIENTO: FONDAP 15130011

SUMMARY

Exosomes are nanometric extracellular vesicles involved in cell communication. The development of “nanovehicles”, such as the exosomes, is an innovative strategy to optimize the drug delivery to specific action sites. On another hand, gold nanoparticles (AuNPs) are interesting candidate for biomedical applications due to its physicochemical properties that allow them to be used for therapy and diagnosis. Previous studies have shown that isolated exosomes from B16F10 cells are accumulated preferentially in the lungs. Consequently, this nanovesicles could be used for the selective delivery of bioactive compounds such as the gold nanoparticles (AuNPs). Therefore, the hypothesis of this work suggests that it is possible to isolate exosomes containing functionalized gold nanoparticles from the supernatant of the B16F10 cell line.

From the above, the goal of this project was developed a strategy for the incorporation of gold nanoparticles (AuNPs) into exosomes that permitting improve the drug delivery of them. For this, we developed functionalized AuNPs with folic acid or R7CLPFFD peptide and later those AuNPs were incubated with B16F10 cell culture. Then, we isolated the nanovesicles by two methods: ultracentrifugation and using the Exospin® kit. Both samples were characterized by dynamic light scattering, zeta potential, transmission electronic microscopy and western blotting. Later, we evaluated the presence of gold in the isolated exosomes samples by UV-visible spectrophotometry and neutronic activation. As result of the proposed strategy, we isolated exosomes containing gold nanoparticles from the B16F10 culture supernatants. Finally, we expect that this nanosystem could be used for the selective delivery of active compounds to the lungs.

FUNDING: FONDAP 15130011

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Entrega de fármacos.

Actualmente el aumento de principios activos disponibles para la terapia de diversas patologías ha generado un gran desafío para el campo de la tecnología farmacéutica. Esto se debe a que muchas de estas moléculas presentan una baja capacidad para llegar de forma selectiva a su sitio de acción por lo que son necesarias nuevas alternativas de administración. A partir de lo anterior, uno de los principales objetivos para la comunidad científica es el desarrollo de sistemas de entrega sitio-dirigida que mejoren estos inconvenientes permitiendo aumentar la efectividad y reducir los efectos adversos de las terapias vigentes¹.

Una de las disciplinas de gran interés para este propósito es la nanotecnología, esto se debe a las características excepcionales que presentan los materiales a nanoescala. Cabe destacar, que estos nanomateriales poseen un tamaño similar a varias moléculas y estructuras biológicas, lo que les permite una mejor interacción con los sitios de interés².

Una de las alternativas que entrega el campo de la nanotecnología es el desarrollo nanovehículos. Entre las ventajas que entregan estos sistemas está modificar las características farmacocinéticas del fármaco, facilitar el paso a través de barreras biológicas y evitar procesos de degradación. Por lo tanto, permiten realizar el transporte del principio activo de una manera más efectiva y selectiva a diferentes sitios de acción¹.

Algunos ejemplos de nanovehículos utilizados son las micelas³, las nanovesículas⁴, las nanoemulsiones⁵ y las nanopartículas metálicas⁶. *En esta memoria se propone el uso de nanovesículas como un posible sistema de entrega de fármacos.*

1.2. Exosomas.

Los exosomas son nanovesículas endógenas de diámetro entre 30-200 nanómetros (nm) involucradas en la comunicación celular⁷. Estas nanovesículas son liberadas por varios tipos celulares y han sido aisladas desde varios fluidos corporales tales como sangre, orina y saliva⁸.

Como se observa en la Figura 1.1. estas nanovesículas se originan a partir de endosomas producto de la endocitosis de agentes externos. Luego, estos endosomas se invaginan y se forman los llamados cuerpos multivesiculares (MVE), los cuales posteriormente se fusionan con la membrana celular para dar paso a la liberación de los exosomas. A partir de esto, es posible encontrar en estas nanovesículas proteínas

involucradas en su formación a partir de cuerpos multivesiculares tales como Alix y TSG101⁹. Asimismo, debido a este mecanismo de formación, los exosomas se diferencian de otras vesículas extracelulares tales como las microvesículas y los cuerpos apoptóticos¹⁰.

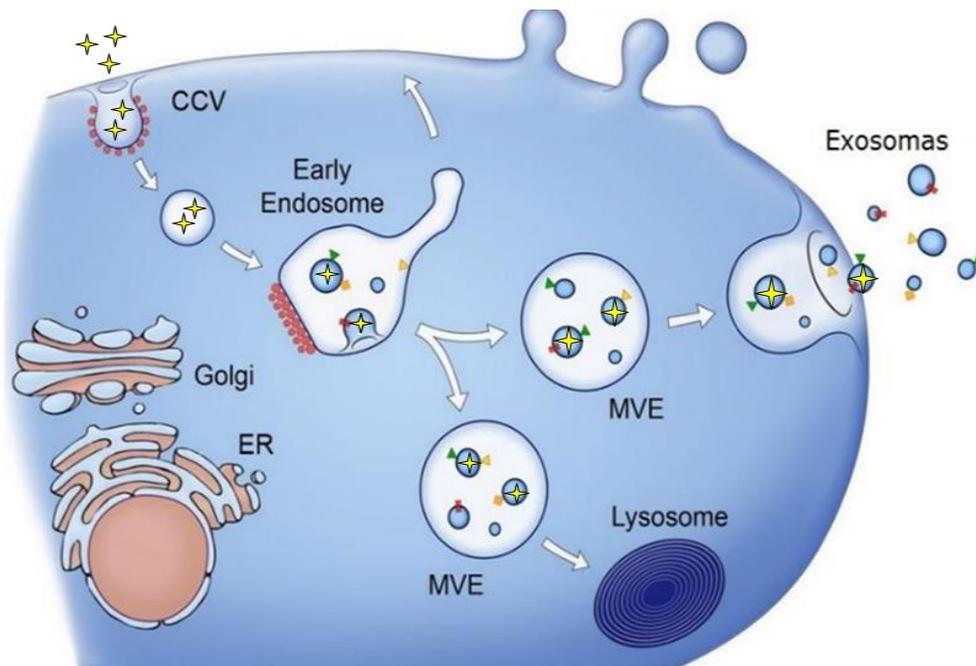


Figura 1.1. Biogénesis de exosomas. (Adaptado de Raposo y cols., 2013)¹¹

Por otra parte, estas nanovesículas poseen un gran potencial para la entrega de fármacos o *drug delivery* ya que son capaces de transportar su contenido hacia células específicas protegiendo su contenido de procesos de degradación¹². Además, debido a su origen endógeno y composición, estas vesículas poseen una mayor biodistribución¹³ y un tropismo hacia determinadas zonas del organismo¹⁴. Asimismo, se ha descrito que la composición de su superficie contribuye a una fusión eficiente entre las nanovesículas y la célula receptora¹⁵, lo cual podría ser útil para una entrega eficiente de fármacos.

A partir de estos antecedentes los exosomas son candidatos interesantes para utilizar como nanovehículos para la entrega de agentes útiles para terapia y/o diagnóstico.

1.2.1. Exosomas derivados de líneas celulares cancerígenas.

Uno de los factores importantes a considerar para el desarrollo de un sistema de entrega de fármacos basado en exosomas es la elección de la célula dadora.

En primera instancia, con el fin de obtener un mejor rendimiento en la producción de los nanovehículos es favorable utilizar líneas celulares que liberen una gran cantidad de nanovesículas. En el caso de las células que poseen un alto potencial proliferativo, se ha visto que éstas realizan una mayor liberación de exosomas¹⁶, por lo tanto, serían una alternativa útil como célula dadora. Por otra parte, se ha observado que las nanovesículas aisladas de estos tipos celulares pueden modular ciertos procesos fisiológicos tales como la apoptosis¹⁷ y la actividad del sistema inmune¹⁸. Adicionalmente, algunas de estas nanovesículas poseen una red de nanofilamentos no proteicos en su superficie que facilitaría la interacción con la membrana y con esto aumentaría su captación celular¹⁹, lo cual podría contribuir a una entrega de fármacos más efectiva.

Por otro lado, es importante mencionar que actualmente se están realizando ensayos clínicos con exosomas derivados de células cancerígenas. Entre algunos de estos estudios está el uso de exosomas autólogos derivados de células dendríticas para el tratamiento de diversas enfermedades. Por una parte, se realizaron ensayos de Fase I en pacientes con melanoma metastásico III/IV y cáncer de pulmón²⁰. Posteriormente, se realizaron estudios de fase II de estos exosomas en combinación con quimioterapia para cáncer de pulmón el cual resultó en efectos estimulatorios sobre el sistema inmune²¹. Asimismo, se han llevado a cabo estudios de fase I con exosomas autólogos derivados de fluido ascítico de tumor de cáncer colorectal²². Esta terapia fue utilizada en 37 pacientes con cáncer colorectal y se observó una respuesta citotóxica favorable contra el tumor.

Adicionalmente, en estudios anteriores se ha descrito que exosomas provenientes de tumores poseen cierto tropismo hacia determinadas zonas del organismo¹⁴. Un ejemplo de esto, es el caso de los exosomas provenientes de la línea celular de melanoma B16F10, los cuales se ha observado que poseen una distribución preferente a nivel pulmonar^{14,23}. Algunos autores proponen que este fenómeno podría ser explicado debido a proteínas de adhesión, tales como las integrinas (ITGs), las cuales están presentes en la superficie de estos exosomas tumorales²⁴.

A partir de esto en este proyecto se utilizarán exosomas que derivan de la línea celular metastásica B16F10 los cuales se esperan ser utilizados para la elaboración de un sistema de entrega de fármacos sitio-dirigida.

1.2.2. Estrategias para cargar exosomas con agentes terapéuticos.

Otro factor importante al momento de llevar a cabo un sistema de *drug delivery* basado en exosomas es la selección del método para incorporar la carga terapéutica (Figura 1.2).

Con el fin de incluir diferentes principios activos al interior de los exosomas, se han empleado diversas estrategias tales como la electroporación⁷, la transfección²⁵ y la activación celular²⁶. Por otro lado, algunos autores han propuesto la posibilidad de incorporar fármacos en exosomas a partir de la incubación de los principios activos con el cultivo celular (Figura 1.2). En este caso, el fármaco es internalizado a la célula y posteriormente es liberado al medio extracelular al interior de los exosomas²⁷. El uso de esta estrategia resulta prometedora ya que no alteraría la integridad de la membrana de las nanovesículas, lo cual podría ser favorable para conservar el *targeting* natural de los exosomas.

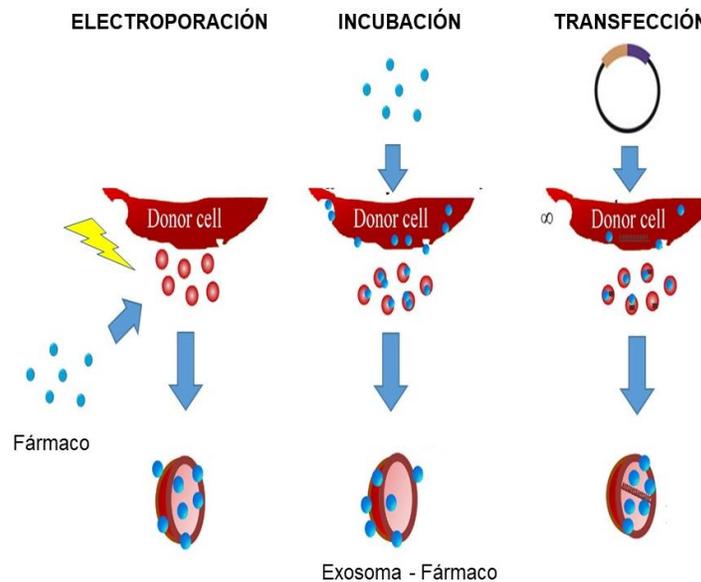


Figura 1.2. Estrategias para la inclusión de principios activos en exosomas. (Adaptado de Batrakova y cols.,2015)²⁸

1.3. Nanopartículas de oro (AuNPs).

Una gran variedad de moléculas han sido encapsuladas en exosomas, sin embargo, la mayoría de estos estudios se han enfocado en la entrega de compuestos que son propios de estas nanovesículas como siRNA²⁵ y miRNA²⁶. En 2017 Roma y colaboradores reportaron que la incubación de las células MCF-7 con nanopartículas de oro permitía la incorporación de las AuNPs en los exosomas²⁹. *En el caso de este proyecto se espera incorporar nanopartículas de oro (AuNPs) en exosomas derivados de la línea celular metastásica B16F10.*

Las AuNPs son nanoestructuras que poseen varias características tales como una gran área superficial, estabilidad química, biocompatibilidad y propiedades ópticas. Además, las AuNPs son sistemas que presentan múltiples propiedades interesantes para ser empleadas en terapia y diagnóstico³⁰.

En estudios anteriores las AuNPs han sido utilizadas en terapia para la entrega de fármacos, terapia génica e incluso para realizar una entrega sitio-dirigida³¹ (Figura 1.3). Esto se debe a que diversos agentes terapéuticos pueden ser acoplados a las AuNPs mediante la unión de un grupo tiol a la superficie de las nanopartículas formando un enlace S-Au estable³². Por otro lado, las AuNPs pueden ser ampliamente utilizadas en diagnóstico como agentes de contraste. Esto debido a que poseen un alto coeficiente de absorción³³ que permite mejorar la definición de imágenes tumorales³⁴.

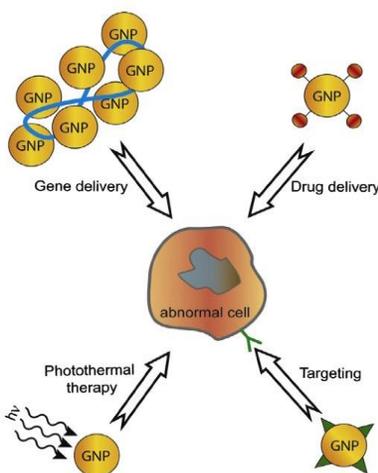


Figura 1.3. Aplicaciones de las nanopartículas de oro en terapia. (Ghosh y cols., 2008)³¹

Adicionalmente, otra propiedad que poseen las AuNPs es la resonancia plasmónica de superficie (SPR) o también llamada efecto plasmón. El plasmón es la oscilación colectiva de los electrones en la superficie del metal, el cual al entrar en contacto con la luz entrega

propiedades que no se encuentran en el material a granel. Un ejemplo de esto es el calor que se libera cuando las AuNPs interaccionan con ciertas longitudes de la radiación electromagnética. Cuando esto ocurre, las nanopartículas tienen la capacidad de absorber esta energía y posteriormente liberarla en forma de calor local sin afectar otras células cercanas³⁵ (Figura 1.4). Esta tecnología se conoce como “cirugía molecular” la cual se ha utilizado para la destrucción selectiva de agregados tóxicos de proteínas³⁶ y en terapias antineoplásicas³⁷.

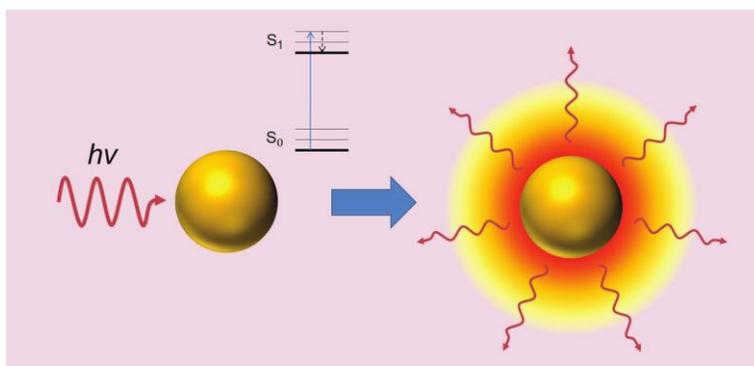


Figura 1.4. Efecto fototérmico en nanopartículas de oro. (Furlani y cols., 2012)³⁸

Debido a las interesantes propiedades de las AuNPs en este trabajo se utilizará el método de incubación para incorporar estas en los exosomas.

1.4. Internalización de las nanopartículas de oro en células.

A partir de los antecedentes anteriormente mencionados, la internalización del agente terapéutico en la célula es fundamental para la posterior liberación de éste en los exosomas. En el caso de las AuNPs, la captación celular es dependiente de múltiples factores tales como el tamaño, la carga superficial, la concentración y el tipo de recubrimiento, entre otros³⁹⁻⁴³.

Por una parte, el tamaño de las AuNPs juega un rol importante en su proceso de internalización celular. En estudios anteriores se ha observado que las AuNPs de 5 nm son internalizadas por difusión pasiva a través de poros transitorios que se producen en la célula pero que no disrumpen la membrana celular. Por otro lado, las AuNPs que poseen tamaños entre 20 a 50 nm son internalizadas por procesos de tipo endocítico mientras que las de tamaños sobre 70 nm no se internalizan eficientemente⁴⁴⁻⁴⁵. A partir de esto, podríamos decir que la captación celular de las AuNPs es inversamente proporcional a su tamaño. Sin

embargo, es importante mencionar que la internalización de las nanopartículas puede variar según la línea celular⁴⁶.

Por otra parte, en estudios recientes se ha demostrado que la internalización celular de las AuNPs está relacionada con su carga superficial. En el caso de las AuNPs cargadas positivamente, estas presentan una mayor captación celular que las nanopartículas cargadas negativamente o neutras. Esto podría explicarse debido a que las AuNPs con carga positiva podrían adherirse a la membrana celular que está cargada negativamente y esto facilitaría su captación celular. Adicionalmente, se ha observado que las AuNPs catiónicas atravesarían la membrana celular mediante la generación de poros transitorios. Este proceso podría ser asociado a una mayor toxicidad celular, ya que también se ha observado que estas AuNPs pueden inducir procesos de hemólisis y agregación plaquetaria⁴⁷⁻⁴⁹.

Asimismo, es posible mejorar la captación celular de las AuNPs a través de la conjugación de éstas con ciertos ligandos específicos. Una molécula interesante para mejorar el direccionamiento y la internalización celular de nanosistemas para *drug delivery* es el ácido fólico (FA). Esto se debe a que el receptor de folato (FR α) está principalmente expresado en células de tipo tumoral a diferencia de lo que ocurre en tejidos normales⁵⁰. En estudios anteriores se ha evaluado el efecto tanto *in vitro* como *in vivo* de la unión de ácido fólico en nanopartículas. Los resultados de estos estudios indican que la funcionalización de AuNPs con FA produce una mejora en cuanto a la selectividad hacia células y tejidos tumorales, aumentando el ingreso intracelular a través de endocitosis mediada por FR α ⁵¹⁻⁵². *En este proyecto se propone la unión de FA a las AuNPs para mejorar la entrada de las nanopartículas a las células B16F10.*

Otra estrategia utilizada para aumentar la internalización celular de las AuNPs es la funcionalización de estas con péptidos de penetración celular (CPPs). Los CPPs son péptidos que están constituidos por 5 a 20 aminoácidos y la mayoría posee un alto contenido de cargas positivas. En estudios anteriores se ha demostrado que estos CPPs son capaces de mejorar la entrega de varias cargas moleculares dentro de la célula de una manera segura, eficiente y no invasiva⁵³.

En el caso de este proyecto se utilizará el péptido de penetración celular R7CLPFFD. Este péptido posee siete argininas en su estructura y éstas son fundamentales para la interacción y el aumento de la captación celular⁵⁴. Sin embargo, debido a la anfipaticidad de la secuencia CLPFFD del péptido, ésta también permite una mejor interacción con los

fosfolípidos de la membrana. Según lo observado anteriormente, estos péptidos pueden atravesar la membrana mediante los mecanismos de translocación directa o de endocitosis, los cuales generan diferentes interacciones entre el péptido y la membrana⁵⁵. En el caso de la translocación directa, las argininas del péptido interactúan con los fosfolípidos de la membrana, proceso que ocurre principalmente en membranas de tipo artificiales. Mientras en la endocitosis, las argininas interactúan con los proteoglicanos de la membrana, lo cual ocurre exclusivamente en células⁵⁴.

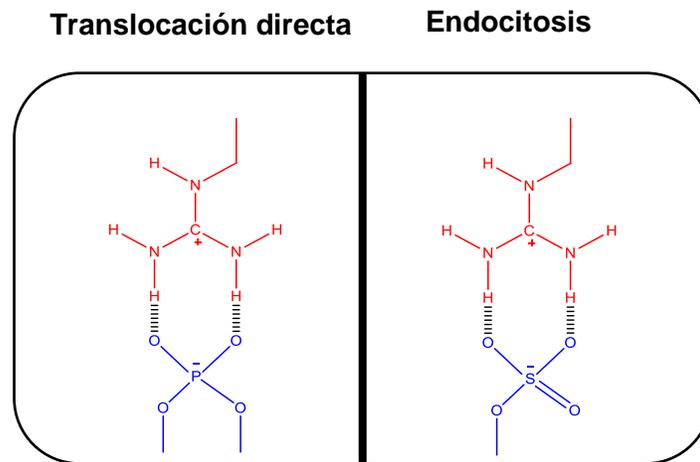


Figura 1.5. Interacción de las argininas de los péptidos de penetración celular con la membrana celular. Interacción con los fosfolípidos de membrana en el mecanismo de translocación directa, en rojo se muestra la arginina y en azul el grupo fosfato. Interacción con los proteoglicanos de la membrana en el mecanismo de endocitosis, en rojo se muestra la arginina y en azul el grupo sulfato. (Schmidt y cols., 2010)⁵⁴

Una vez incorporadas las AuNPs en las células se espera que estas sigan la vía endosomal y finalmente sean incluidas en los exosomas. En el 2013, Marchesano y cols. realizaron un estudio del tráfico de internalización y externalización de AuNPs en un modelo animal invertebrado. Los resultados de esta investigación demostraron que estas nanopartículas ingresaban a las células por la vía endosomal y posteriormente podían ser secretadas al interior de estas nanovesículas⁵⁶.

En este proyecto se espera que las AuNPs se internalicen en las células B16F10 y que posteriormente estas sean liberadas en exosomas (Figura 1.6).

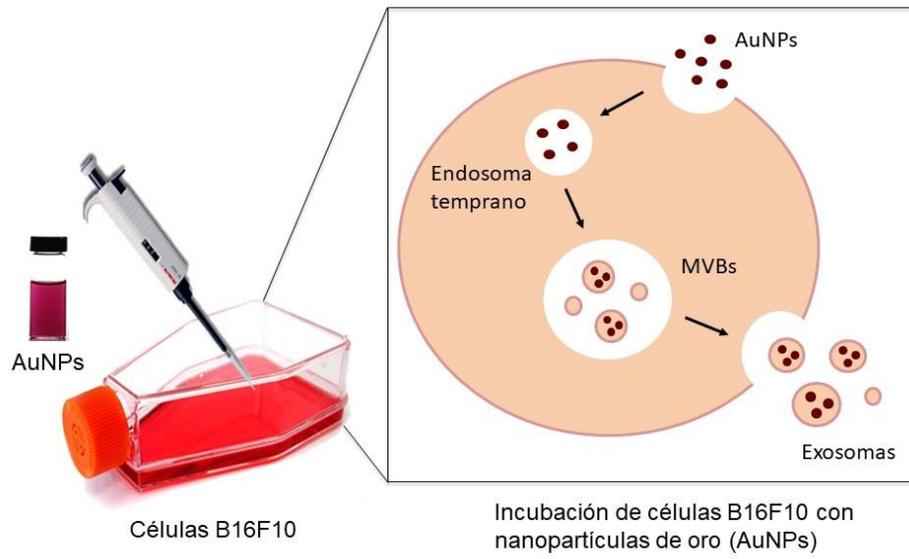


Figura 1.6. Esquema que representa la estrategia de incubación para la incorporación de las AuNPs en exosomas provenientes de las células B16F10.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Es posible aislar exosomas que contienen nanopartículas de oro funcionalizadas a partir del sobrenadante de la línea celular B16F10.

2.2. Objetivo general

Aislar exosomas con inclusión de nanopartículas de oro funcionalizadas desde la línea celular B16F10.

2.3. Objetivos específicos

2.3.1. Obtener y caracterizar nanopartículas de oro recubiertas con polietilenglicol (AuNP-PEG) y funcionalizadas con ácido fólico (AuNP-PEG-FA) y R7CLPFFD (AuNP-PEG-R7CLPFFD).

2.3.2. Evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas de oro funcionalizadas en la línea celular B16F10.

2.3.3. Evaluar *in vitro* la penetración celular de las nanopartículas de oro funcionalizadas en la línea celular B16F10.

2.3.4. Aislar y caracterizar exosomas con inclusión de nanopartículas de oro funcionalizadas desde la línea celular B16F10.

2.3.5. Evaluar la incorporación de las nanopartículas de oro funcionalizadas en exosomas aislados de la línea celular B16F10.

2.3.6. Optimizar el aislamiento de exosomas con inclusión de nanopartículas de oro funcionalizadas mediante el kit comercial Exospin®.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron los siguientes materiales: Sal áurica (HAuCl₄) (P.M. 339,79), citrato trisódico dihidratado (Na₃C₆H₅O₇·2H₂O) (P.M. 294,1), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (P.M. 191,7), N-hidroxisuccinimida (NHS) (P.M. 115,09), ácido fólico (P.M. 441,4), amortiguador fosfato salino (PBS) y amortiguador MES los cuales fueron adquiridos por la empresa Sigma-Aldrich. Los polímeros HS-PEG₅₀₀₀-COOH y HS-PEG₅₀₀₀-OMe (P.M. 5000) fueron obtenidos por la empresa Jenkem Technology desde Beijing, China. El péptido R7CLPFFD fue obtenido a partir de una síntesis en fase sólida realizada previamente por nuestro grupo de laboratorio. El fluoróforo Alexa-647 fue adquirido en INVITROGEN, USA.

Por otra parte, para el cultivo celular se utilizó la línea celular de melanoma de pulmón B16F10 que fue adquirida por medio de ATCC. El suero fetal bovino (SFB) es de Hyclone, USA mientras el medio de cultivo RPMI 1640 y la penicilina/estreptomicina son de GIBCO, USA. En el caso de las botellas de cultivo de 225cm² y el kit de microBCA™ estas son de ThermoFisher Scientific, USA. El ensayo de citotoxicidad MTS es de Promega, USA y el *kit* de aislamiento Exospin® fue adquirido a través de Cell Guidance Systems, UK. Para la tinción del núcleo de las células se utilizó Hoetch (P.M. 615,99) de Life Technologies, USA y para el montaje de las muestras para microscopía confocal se usó el medio de montaje Fluoromont G de Electron Microscopy Sciences, USA. Finalmente, los anticuerpos utilizados fueron TSG101 de Santa Cruz (sc-7964) y Calnexina de Novus Biologicals (NB100-1965).

3.1. Obtener y caracterizar nanopartículas de oro recubiertas con polietilenglicol (AuNP-PEG) y funcionalizadas con ácido fólico (AuNP-PEG-FA) y R7CLPFFD (AuNP-PEG-R7CLPFFD).

3.1.1. Síntesis de nanopartículas de oro.

La síntesis de las nanopartículas de oro (AuNP-cit) se realizó por reducción de la sal áurica HAuCl_4 con citrato trisódico como agente reductor y estabilizante. Para esto se empleó el método de Turkevich⁵⁷ modificado posteriormente por Levy y cols⁵⁸.

En primer lugar, se prepararon 100 mL de una solución acuosa de HAuCl_4 1,0 mM y se colocó en un balón de tres bocas de 250 mL. Sobre su boca central se conectó un sistema de reflujo simple y en cada una de las bocas laterales una septa. El balón se dejó sobre una manta de calefacción con agitador magnético para lograr una mezcla continua y se llevó el sistema completo a un reflujo durante 5 minutos. Luego, se agregó rápidamente 5 mL de una solución acuosa de citrato trisódico dihidratado 38,8 mM a 60°C por una de las bocas laterales del balón. El sistema se mantuvo a reflujo por exactamente 30 minutos más, y una vez terminado el tiempo se dejó enfriar el balón a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró la solución usando filtros de PVDF de 0,45 μm y se ajustó el pH entre 7-8. Finalmente, la dispersión coloidal de AuNPs recubiertas de citrato (AuNP-cit) se almacenó a 4°C.

3.1.2. Conjugación de AuNP-cit con polietilenglicol y funcionalización con ácido fólico y con el péptido R7CLPFFD.

Con el fin de mejorar la captación celular de las AuNPs estas se funcionalizaron con ácido fólico (FA) o con el péptido R7CLPFFD. En el caso del FA este permite favorecer la captación celular por endocitosis mediada por receptores⁵¹⁻⁵² mientras que R7CLPFFD actúa por translocación directa y/o endocitosis⁵⁵. Para llevar a cabo esto, primero se conjugó las AuNP-cit con polietilenglicol y posteriormente se funcionalizaron con las moléculas que permiten mejorar la captación celular (FA o R7CLPFFD).

Para la obtención de AuNPs conjugadas con polietilenglicol (PEG) se modificó el protocolo utilizado por Huang y cols, 2010⁵⁹. Primero, se colocó 10 mL de la solución de AuNP-cit 5 nM en un vial de vidrio. Posterior a esto, se agregó 50 μL de una solución de HS-PEG₅₀₀₀-OMe 1 mg/200 μL de agua Milli-Q y se dejó en agitación durante 10 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, el vial se sonicó para desprender las nanopartículas adheridas en el vidrio y luego se centrifugaron las AuNPs a 16.000 x g por 60 minutos. A continuación, se resuspendió el *pellet* en 10 mL de agua Milli-Q y se agregó 300 μL de una

solución de HS-PEG₅₀₀₀-COOH 1 mg/200 µL de agua Milli-Q que se dejó en agitación durante 1 hora. Luego, se sonicó nuevamente el vial y la solución se centrifugó a 16.000 x g por 60 minutos para poder eliminar el exceso de polímero que no está interactuando con la superficie de las AuNPs. Para finalizar, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* con agua Milli-Q y así se obtuvo AuNP-PEG-COOH/OMe que se almacenó a 4°C.

Para realizar la funcionalización con FA y R7CLPFFD se utilizó la reacción de acoplamiento 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/ N-hidroxisuccinimida (NHS) (Figura 3.1). A partir del nanoconjugado AuNP-PEG-COOH/OMe se realizó la activación de su grupo carboxílico para ser posteriormente conjugado con FA ó R7CLPFFD a través de un enlace amida. Para esto, primero se centrifugaron las AuNP-PEG-COOH/OMe obtenidas con anterioridad a 16.000 x g por 60 minutos. Mientras, se masó 1 mg de EDC y 2,5 mg de NHS y se resuspendieron en 100 µL de buffer MES 0,1 M pH 5,5. A continuación, se agregó esta mezcla al *pellet* resultante de AuNP-PEG-COOH/OMe y se sonicó la mezcla durante 15 minutos. Posteriormente, se centrifugaron las AuNPs a 16.000 x g por 60 minutos para retirar el exceso de EDC/NHS que no interactuó con los grupos carboxílicos de las nanoesferas. Transcurrido el tiempo, se agregó 500 µL de ácido fólico 1 mg/mL de PBS 1x ó 500 µL del péptido R7CLPFFD 1 mg/mL de agua Milli-Q y se dejó incubar durante toda la noche con una agitación de 300 rpm a 25° C. Al día siguiente se centrifugaron las AuNPs a 16.000 x g por 60 minutos para eliminar el FA ó R7CLPFFD no unido y finalmente se resuspendió el *pellet* en agua Milli-Q.

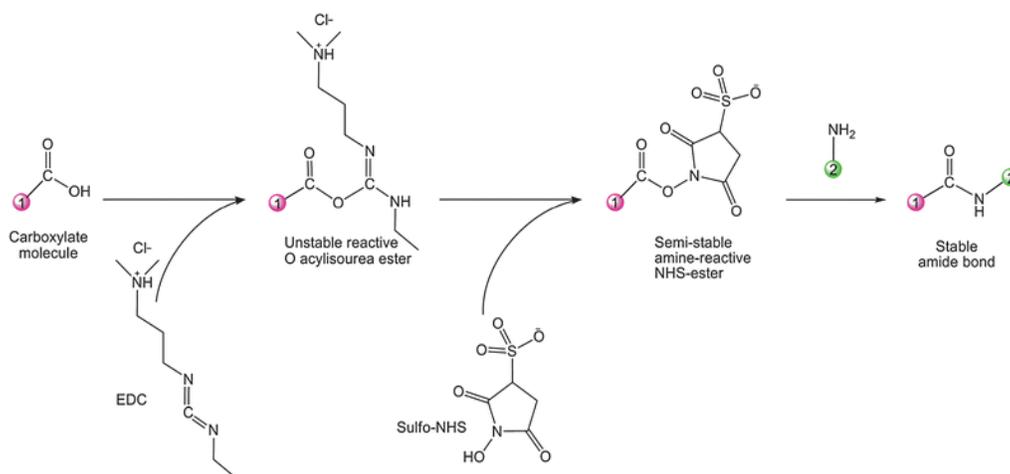


Figura 3.1. Esquema de la reacción de acoplamiento 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/ N-hidroxisuccinimida (NHS).

3.1.3. Caracterización de las AuNP-cit y sus conjugados AuNP-PEG, AuNP-PEG-FA y AuNP-PEG-R7CLPFFD.

Con el objetivo de caracterizar los nanosistemas obtenidos se utilizaron las siguientes metodologías:

3.1.3.1. Espectrofotometría UV-visible (UV-vis) para determinar la banda del plasmón superficial de las AuNPs. Se registraron los espectros de absorción UV-visible a temperatura ambiente con un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo Lambda 25 UV. Para esto se midieron las diferentes muestras de AuNPs en cubetas de plástico en una dilución de 1:10. La medición se realizó en el rango de longitud de onda de 400 a 700 nm y se utilizó como blanco citrato 1,2 mM para las AuNP-cit y agua Milli-Q para el resto de los nanoconjugados.

3.1.3.2. Dispersión dinámica de la luz (DLS) para determinar el diámetro hidrodinámico y el índice de polidispersión de las AuNPs. Se utilizó el equipo Malvern ZetaSizer Nano ZS que opera a una longitud de onda de fuente de luz de 633 nm y un ángulo de dispersión fijo de 173°. Para esto se realizó una dilución de 1:50 de cada nanosistema utilizando como dispersante citrato 1,2 mM para las AuNP-cit y agua Milli-Q para el resto de los nanoconjugados. Cada muestra se colocó en una celda de camino óptico de 1 cm y se midió un mínimo de tres veces por muestra. Los resultados se expresan en términos de diámetro hidrodinámico ($D_h \pm SD$) e índice de polidispersión (Pdi).

3.1.3.3. Micro-electroforesis de láser Doppler para determinar la carga superficial de los nanosistemas. Para esto se utilizó el equipo Malvern ZetaSizer Nano ZS y se realizó una dilución de 1:50 de cada nanosistema utilizando como dispersante citrato 1,2 mM para las AuNP-cit y agua Milli-Q para los demás nanoconjugados. Posteriormente, se colocó cada dilución en una celda capilar desechable y se midió realizando un mínimo de 5 mediciones. Finalmente, los resultados se expresan en términos de potencial zeta ($mV \pm SD$).

3.1.3.4. Microscopía electrónica de transmisión (modo STEM) para determinar la morfología de las nanopartículas. Para realizar esta caracterización se depositó una gota de 20 μ L del nanoconjugado sobre una rejilla de cobre de 200 mesh recubierta con el polímero *formvar*. Posterior a esto, se agregó ácido fosfotúngstico al 1% para teñir la materia orgánica producto de la funcionalización de las AuNPs. A continuación, se retiró el exceso de ácido fosfotúngstico y se dejaron secar las rejillas toda la noche a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, las muestras se observaron al microscopio FEI Inspect

50 empleando una aceleración de los electrones desde 120keV utilizando el modo STEM. Finalmente, se midieron 100 partículas en las micografías obtenidas empleando el programa ImageJ, posteriormente estos datos se representaron como histogramas de tamaño como número de esferas (%NE) vs diámetro.

3.2. Evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas de oro funcionalizadas en la línea celular B16F10.

Con el propósito de evaluar el efecto de las AuNPs funcionalizadas sobre la viabilidad de la línea celular B16F10 se utilizó el método colorimétrico 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxifenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio (MTS). El ensayo colorimétrico de MTS se basa en la reducción de la sal de tetrazolio (MTS) a formazán. Esta reacción es producida por las enzimas deshidrogenasas presentes en la mitocondria de las células metabólicamente activas. Por lo tanto, la cantidad de formazán producido es proporcional al número de células vivas del cultivo.

Para esto, se sembró aproximadamente 10.000 células B16F10 en cada pocillo en multiplacas de 96 pocillos y se mantuvieron con RPMI suplementado con 1% de SFB. Luego, las células se incubaron con concentraciones de 0,1, 1, 2 y 4 nM de AuNP-PEG-FA ó AuNP-PEG-R7CLPFFD en cada pocillo por 24 horas a 37°C y 5% pCO₂. Además, se realizaron controles con células incubadas en medio RPMI con 1% de SFB (control de vida), con SDS al 20% (control de muerte) y con agua Milli-Q (control de vehículo). Transcurrido el tiempo, se descartó el medio del pocillo y se agregaron 90 µL de RPMI y 10 µL de la mezcla MTS/PMS dejando incubar la placa entre 1 a 2 horas. Finalmente, se midió la diferencia de absorbancia (Abs 490nm – Abs 655nm) utilizando el lector de placa Perkin Elmer Luminiscence Espectroscope LS50B. Finalmente, los resultados obtenidos fueron analizados a través de un análisis estadístico de tipo ANOVA utilizando el software GraphPad Prism®. La diferencia significativa fue de P < 0,05.

3.3. Evaluar *in vitro* la penetración celular de las nanopartículas de oro funcionalizadas en la línea celular B16F10.

3.3.1. Captación/adherencia por plasmón superficial.

Con el fin de evaluar la internalización/adherencia de las AuNPs en las células B16F10 se realizó un ensayo basado en su plasmón superficial.

Para esto se sembraron aproximadamente 50.000 células/pocillo en multiplacas de 24 pocillos y se dejaron incubar durante 24 horas a 37 °C y 5% pCO₂. Posteriormente, se agregó AuNP-PEG-FA ó AuNP-PEG-R7CLPFFD 10 nM y se dejaron incubar las células con las AuNPs por tiempos de 4 a 6 horas. Pasado el tiempo se retiró el medio de cultivo y se midió por espectrofotometría UV-visible para determinar el máximo de absorción. Finalmente se analizaron los resultados para determinar la concentración de AuNPs en el sobrenadante a partir de la ley de Beer-Lambert. A partir de la diferencia entre la concentración inicial de AuNPs y el remanente en el medio de cultivo luego de la incubación se obtuvo la concentración de AuNPs adheridas o captadas por las células. Finalmente, los resultados obtenidos fueron analizados a través de un análisis estadístico de tipo ANOVA utilizando el software GraphPad Prism®. La diferencia significativa fue de $P < 0,05$.

3.3.2. Captación/adherencia celular por microscopía confocal.

Por otro lado, para estudiar si las AuNP-PEG-R7CLPFFD son internalizadas por la línea celular B16F10 se evaluó su captación a diferentes tiempos a través de microscopía confocal. Para esto, se marcaron las AuNP-PEG-R7CLPFFD con el fluoróforo Alexa-647 permitiendo el seguimiento de las nanopartículas a través de fluorescencia.

Además, se subcultivó 100.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos con cubreobjetos de 12 mm de diámetro dejándose incubar hasta alcanzar un 80% de confluencia. A continuación, se agregaron 50 µL de AuNP-PEG-R7CLPFFD-Alexa₆₄₇ 10 nM dejándose incubar por 2 y 6 horas. Seguidamente, se lavó con PBS 1x para retirar las AuNPs no internalizadas y se fijaron las células con 300 µL de paraformaldehído (PAF) por 10 minutos a 4°C. Luego se agregaron 500 µL de Hoetch (1:1000) por 15 minutos a temperatura ambiente para lograr la tinción del núcleo de la célula. Una vez realizado esto, se adicionaron 400 µL de glicina 50 nM por 20 minutos y se lavaron con PBS 1x. Posteriormente, se agregaron 8 µL de medio de montaje sobre un portaobjetos y posteriormente se colocó el cubreobjetos con las células sobre él. Finalmente, se dejaron secar las muestras por 24 horas a temperatura ambiente y luego se almacenaron a 4°C.

Una vez secas las muestras estas fueron observadas a través de un microscopio confocal Eclipse TI, Nikon Instruments.

3.3.3. Captación/adherencia celular por activación neutrónica.

Con el fin de cuantificar la cantidad de oro internalizada o que se adhiere a las células B16F10 se enviaron las muestras a la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN) para determinar la cantidad de oro a través de la técnica de análisis por activación neutrónica (AAN).

Para realizar esto, se sembraron 60.000 células B16F10 por pocillo en multiplacas de 24 pocillos con RPMI suplementado con 1% de SFB. Luego, se agregaron las AuNP-PEG-FA ó AuNP-PEG-R7CLPFFD 10 nM a los tiempos de 2, 4, 6 y 24 horas. Pasado el tiempo correspondiente, se lavó cada pocillo 5 veces con PBS 1x para eliminar las AuNPs que no interactuaron con las células B16F10. A continuación, se agregó 50 μ L de tripsina 1x a cada pocillo para desprender las células de la placa. Luego, se recolectaron las alícuotas de cada pocillo y se realizaron tres lavados con PBS 1x que fueron recolectados con el fin de arrastrar el resto de las células. Finalmente, se evaporó el solvente de las muestras con una lámpara infrarroja y se enviaron las muestras a la CCHEN.

Para la cuantificación de oro por AAN las muestras fueron selladas y expuestas por 17 horas a un flujo de neutrones de 0.25–1.3 n/cm²s con un poder de 5 mW gatillando así la conversión de ¹⁹⁷Au a ¹⁹⁸Au. Después de 7-12 días de bombardeo con neutrones, los rayos γ emitidos por las muestras fueron contados y separados por energía usando un detector de germanio acoplado a un espectrómetro multicanal de rayos γ y acoplado a un computador. El espectro de rayos γ fue analizado usando el software SAMPO90 Canberra. Los resultados de masa total de los elementos fueron determinados con su incertidumbre asociada, calculada con un factor de cobertura igual a 2, lo que equivale a aproximadamente a un nivel de confianza del 95%. Los resultados fueron expresados en nanogramos (ng) totales. Los resultados obtenidos fueron representados a través de un gráfico de Masa de Au (ng) vs tiempo de incubación indicando la desviación estándar (SD). Finalmente, los resultados obtenidos fueron analizados a través de un análisis estadístico de tipo ANOVA utilizando el software GraphPad Prism®. La diferencia significativa fue de $P < 0,05$.

3.4. Aislar y caracterizar exosomas con inclusión de nanopartículas de oro funcionalizadas desde la línea celular B16F10.

3.4.1. Aislar y caracterizar exosomas desde la línea celular B16F10.

3.4.1.1. Cultivo celular.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó la línea celular de melanoma de pulmón B16F10 proveniente de ratón. Para esto, se cultivaron las células B16F10 en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de los antibióticos penicilina/estreptomicina y se mantuvieron en una incubadora a 37° C y 5% de pCO₂.

3.4.1.2. Preparación del suero fetal bovino para aislamiento de exosomas.

Para realizar el aislamiento de las nanovesículas desde la línea celular B16F10 es necesario descartar la presencia de vesículas extracelulares de origen bovino que interfieran con nuestro experimento. Para esto se realizó la ultracentrifugación del SFB según el protocolo de Théry y cols., 2006⁶⁰ para obtener un suero libre de vesículas (SFB *exo-free*).

Primero se descongeló el suero fetal bovino y se llenaron los tubos de ultracentrifuga a $\geq \frac{3}{4}$ de su capacidad. Luego, se ultracentrifugó utilizando un rotor de tipo *swinging bucket* a 100.000 x g por un tiempo mínimo de 16 horas a 4°C. Transcurrido el tiempo, se recolectó el sobrenadante, se filtró a través de un filtro de PDVF de 0,22 μ m bajo campana de flujo laminar y se almacenó a -20°C. Posteriormente, el aislamiento de exosomas se realizó con medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de SFB *exo-free* y 1% de penicilina/estreptomicina (RPMI completo *exo-free*).

3.4.1.3. Obtención del medio para aislamiento de exosomas.

Con el fin de obtener el medio para aislamiento de exosomas desde la línea celular B16F10, se subcultivaron las células con 25 mL de RPMI completo *exo-free* en botellas de cultivo de 225 cm². Aproximadamente 48 horas después, cuando las células crecieron hasta un 80% de confluencia, se recolectó el sobrenadante y se almacenó a -80°C.

3.4.1.4. Aislamiento de exosomas desde la línea celular B16F10.

3.4.1.4.1. Aislamiento de exosomas por el método de ultracentrifugación (UC).

Para realizar el aislamiento de las nanovesículas desde la línea celular B16F10 se utilizó el protocolo de ultracentrifugación modificado descrito por Théry y cols., 2006⁶⁰.

Al momento de ejecutar el aislamiento se descongeló el medio previamente recolectado (ver sección 3.4.1.3) y se centrifugó a 2.000 x g por 20 minutos a 4° C. Posteriormente se rescató el sobrenadante y se realizó una segunda centrifugación a 12.000 x g por 45 minutos a 4° C. Luego, se recolectó nuevamente el sobrenadante y se filtró a través de un filtro de PVDF de 0,22 µm bajo campana de flujo laminar. Este filtrado se traspasó a tubos de ultracentrifuga a $\geq \frac{3}{4}$ de su capacidad y se ultracentrifugó a 110.000 x g por 2 horas a 4° C. A continuación, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* con buffer fosfato salino (PBS) 1x para realizar nuevamente una ultracentrifugación a 110.000 x g por 2 horas a 4° C. Finalmente, se resuspendió el *pellet* que contiene las nanovesículas en 1 mL de PBS 1x y se almacenó a -80°C.

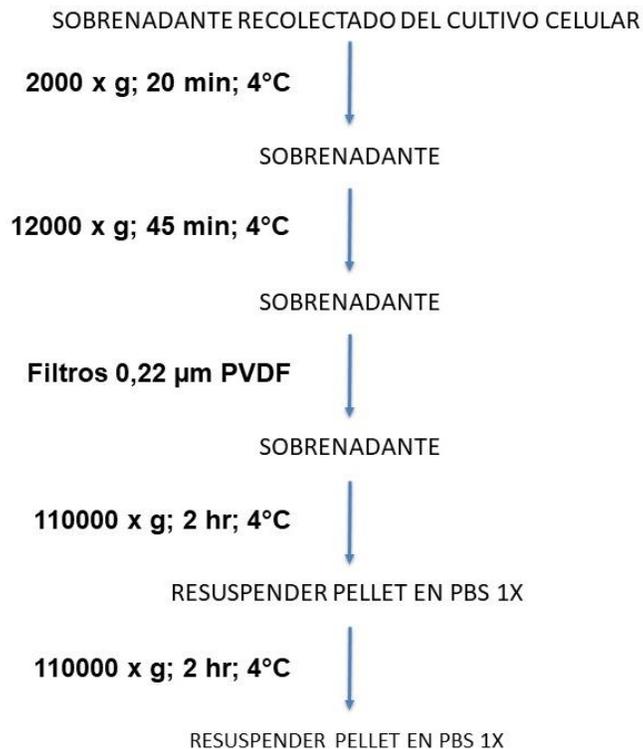


Figura 3.2. Esquema resumen para la obtención de exosomas por ultracentrifugación (UC).

3.4.1.4.2. Aislamiento de exosomas empleando el *kit* comercial Exospin®.

Con el propósito de evaluar diferentes métodos de obtención de exosomas se utilizó el *kit* comercial Exospin®. Para llevar a cabo el aislamiento, primero se realizó una centrifugación a 300 x g por 10 minutos del medio recolectado en la sección 3.4.1.3 con el fin de descartar las células en suspensión. A continuación, el sobrenadante se centrifugó a 16.000 x g por 30 minutos para remover los desechos celulares. Una vez realizado esto, se incubó el sobrenadante con el “Buffer A” suplementado por el *kit* Exospin® durante toda la noche. Transcurrido el tiempo, se centrifugó la mezcla a 16.000 x g por 60 minutos y el *pellet* resultante se resuspendió en 100 µL de PBS 1x. Seguido a esto, se aplicó el *pellet* a la columna de Exospin® y se centrifugó a 50 x g por 60 segundos. Finalmente, se agregó 200 µL de PBS 1x en la parte superior de la columna y se centrifugó a 50 x g por 60 segundos. El volumen que eluyó corresponde a los exosomas provenientes de la línea celular B16F10.

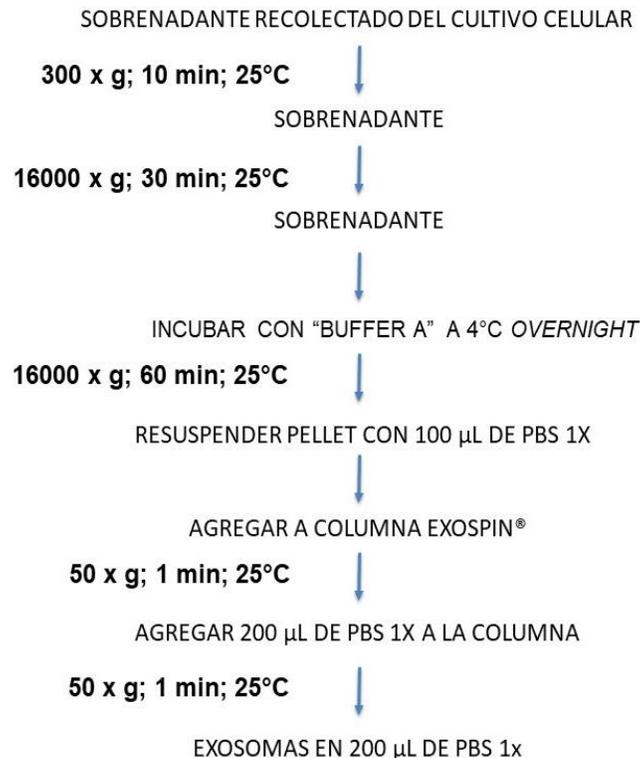


Figura 3.3. Esquema resumen para la obtención de exosomas por el *kit* comercial Exospin®.

3.4.1.5. Caracterización de las nanovesículas obtenidas por método de ultracentrifugación y kit comercial Exospin®.

Con el objetivo de caracterizar y comparar los métodos de aislamiento de exosomas utilizados, se realizó dispersión dinámica de la luz (DLS), micro electroforesis de láser doppler (potencial zeta), microscopía electrónica de transmisión (STEM) y *western blot*.

3.4.1.5.1. Dispersión dinámica de la luz y micro-electroforesis de láser Doppler.

Para evaluar el diámetro hidrodinámico, la dispersión de tamaño y la carga superficial de los exosomas se utilizó el equipo Malvern ZetaSizer Nano ZS. Para la medición de la muestra obtenida por ultracentrifugación (UC), se tomó una alícuota de 50 μL de la muestra de exosomas y se diluyó en 950 μL de PBS 1x. Mientras que para la muestra obtenida por el kit comercial se tomó una alícuota de 20 μL de muestra y se diluyó en 980 μL de PBS 1x. Finalmente, se colocó cada dilución en una celda capilar desechable y se midió en el equipo realizando un mínimo de tres mediciones por muestra. Los resultados se expresan en términos de diámetro hidrodinámico ($D_h \pm SD$), índice de polidispersión (Pdi) y potencial zeta ($mV \pm SD$).

3.4.1.5.2. Microscopía electrónica de transmisión.

Con el fin de determinar la morfología de las nanovesículas aisladas estas se observaron a través de microscopía electrónica de transmisión (modo STEM). Para esto se depositó 10 μL de cada muestra teñida con ácido fosfotúngstico al 0,5% sobre una rejilla de cobre de 200 mesh recubierta con el polímero formvar. Esta se dejó secar toda la noche y una vez transcurrido el tiempo se observó al microscopio FEI Inspect 50. Finalmente, se midieron 50 partículas en las microfografías obtenidas empleando el programa ImageJ, posteriormente estos datos se representaron como histogramas de tamaño por número de exosomas (% Exosomas) vs diámetro.

3.4.1.5.3. Western blot.

3.4.1.5.3.1. Cuantificación de proteínas mediante el método de microBCA.

Para cuantificar las proteínas presentes en las muestras de exosomas aislados se empleó el kit de cuantificación microBCA™ utilizando para la curva de calibración la proteína seroalbúmina bovina (BSA). El *kit* de microBCA™ se basa en el uso de ácido bicinconínico (BCA) la cual es sal sódica capaz de formar un complejo de color púrpura intenso con iones Cu^{+1} en medio alcalino. A partir de esto, este reactivo es utilizado para

monitorizar el ión Cu^{+1} producido por la interacción entre Cu^{+2} y los enlaces peptídicos de las proteínas en medio alcalino (reacción de Biuret)⁶¹.

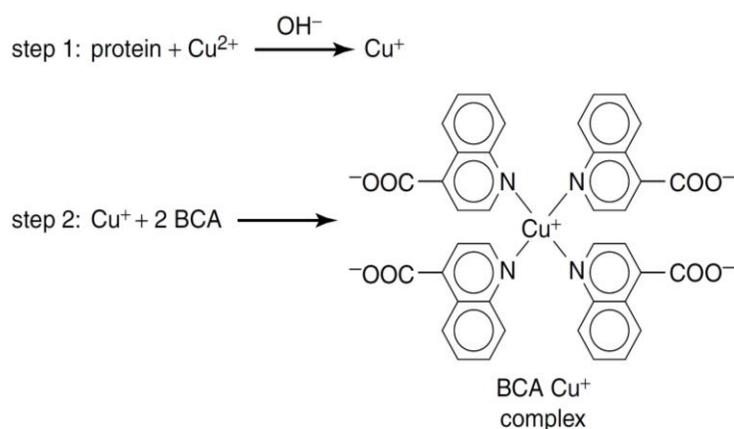


Figura 3.4. Esquema del fundamento del kit de cuantificación de proteínas microBCA™. (Krohn, 2011)

Para esto, se realizó una curva de calibración con BSA (2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con concentraciones entre 2000 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se utilizó como blanco PBS 1x. Por otro lado, se diluyeron las muestras de exosomas y se agregaron 25 μL a cada pocillo en triplicado a una multiplaca de 96 pocillos. Además, se preparó la solución reactiva (WR) del kit MicroBCA™ utilizando la proporción de Reactivo A (25): B (24): C (1) respectivamente y se agregó 25 μL de esta en cada pocillo con muestra. A continuación, se agitó durante 30 segundos y se incubó a 37°C durante 2 horas. Transcurrido el tiempo se midió la absorbancia a 562 nm utilizando el lector de placa Perkin Elmer Luminiscence Espectroscopie LS50B.

3.4.1.5.3.2. Preparación de las muestras.

Una vez cuantificada la cantidad de proteínas de las muestras, se tomó un volumen de una alícuota que contenía 50 μg de proteína total y se llevó a 25 μL de volumen final empleando el SpeedVac™. Previamente a cargar las muestras en el gel estas se diluyeron en una relación de 1:5 con buffer de carga 1x y se incubaron en un baño a 100° C por cinco minutos.

3.4.1.5.3.3. Preparación de los geles.

Con el fin de obtener una óptima separación de las proteínas se preparó un *lower* gel de poliacrilamida/SDS al 12,5% y un gel *upper* al 3% en una estructura de vidrio con 1,5 mm de grosor. Una vez cargado el *upper* gel se realizaron bolsillos de 0,75 mm cada uno para posteriormente cargar las muestras.

GEL SEPARADOR 12,5%		GEL CONCENTRADO 3%	
AGUA	4,375 mL	AGUA	3,25 mL
ACRI/BIS 40%	3,125 mL	ACRI/BIS 40%	0,5 mL
LOWER TRIS	2,5 mL	UPPER TRIS	1,25 mL
PERSULFATO DE AMONIO (APS) 10%	45 uL	PERSULFATO DE AMONIO (APS) 10%	30 uL
TETRAMETILETILENDIAMINA (TEMED)	15 uL	TETRAMETILETILENDIAMINA (TEMED)	15 uL

Tabla 3.1. Volúmenes para la preparación del gel separador y gel concentrado.

3.4.1.5.3.4. Electroforesis en gel.

Para realizar la etapa de electroforesis o separación de las proteínas se montó la cámara de electroforesis junto con las láminas de vidrio con el gel y se añadió el amortiguador de corrida hasta cubrir la totalidad de las láminas de vidrio. A continuación, se cargó el estándar (st Thermo #26616) y las muestras preparadas y estas se sometieron a electroforesis aplicando un potencial de 80 volts (V) hasta que las muestras pasaron al gel separador. Finalmente, las proteínas se resolvieron por electroforesis a un voltaje de 100 V durante aproximadamente una hora (hasta alcanzar el frente de migración).

3.4.1.5.3.5. Electrotransferencia.

Con el objetivo de realizar la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se desmontó el gel desde la cámara de electroforesis y se retiró el gel concentrado con una espátula. Seguido a esto, se preparó el gel separador con la membrana de nitrocelulosa y se montó en la cámara de transferencia con el amortiguador de transferencia en frío. La electrotransferencia de las proteínas hacia la membrana de nitrocelulosa se realizó a 100 V por exactamente 75 minutos en presencia de hielo.

3.4.1.5.3.6. Inmunodetección.

Al finalizar la transferencia se desmontó el sistema y se bloqueó la membrana con una solución de 5% de leche en PBS-0,1% tween durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se cortó la membrana en segmentos según el tamaño de las proteínas de interés y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 3.2.) durante toda la noche a 4°C. Transcurrido el tiempo, se lavaron las membranas tres veces con PBS-0,1% tween y se incubaron por una hora a temperatura ambiente con los anticuerpos

secundarios que corresponde los cuales se indican en la Tabla 3.2. Finalmente, se lavó tres veces las membranas con PBS–0,1% tween y se incubaron en oscuridad con el sustrato quimioluminiscente ECL durante 5 minutos a temperatura ambiente. La obtención de las imágenes se realizó a través del equipo de revelado con cámara digital Hamamatsu (Discovery Gene Xpress) y a través del software Ultraquant.

Anticuerpo primario (Preparado en 5% leche disuelto en PBS 1x – 0,1 % Tween)	Anticuerpo secundario (Preparado en 5% leche disuelto en PBS 1x – 0,1 % Tween)
TSG101 monoclonal (45 kDa) (1:200)	Anti-Ratón (1:5000)
Calnexina policlonal (97 kDa) (1:500)	Anti-Conejo (1:5000)

Tabla 3.2. Anticuerpos utilizados para *western blotting* en la caracterización de exosomas provenientes de la línea celular B16F10.

3.4.2. Aislar y caracterizar exosomas con inclusión de nanopartículas de oro funcionalizadas desde la línea celular B16F10.

3.4.2.1. Obtención del medio para aislamiento de exosomas con inclusión de nanopartículas de oro funcionalizadas.

Para incorporar las AuNPs en los exosomas se utilizó como estrategia de inclusión la incubación de las células B16F10 con las AuNPs. Para esto, se sembraron las células en botellas de cultivo de 225 cm² y se dejaron crecer hasta alcanzar un 70-80% de confluencia. Una vez ocurrido esto, se agregó 2,5 mL de AuNP-PEG-FA ó AuNP-PEG-R7CLPFFD 10 nM y se incubó durante 6 horas. Transcurrido el tiempo, se lavaron las células 3 veces con PBS 1x para retirar los restos de AuNPs que no se internalizaron o que podían estar adheridos en la superficie celular. Luego, se agregó medio RPMI completo *exo-free* y se dejaron incubando durante 24 horas. Finalmente, se retiró el sobrenadante del cultivo celular y se almacenó a – 80 °C.

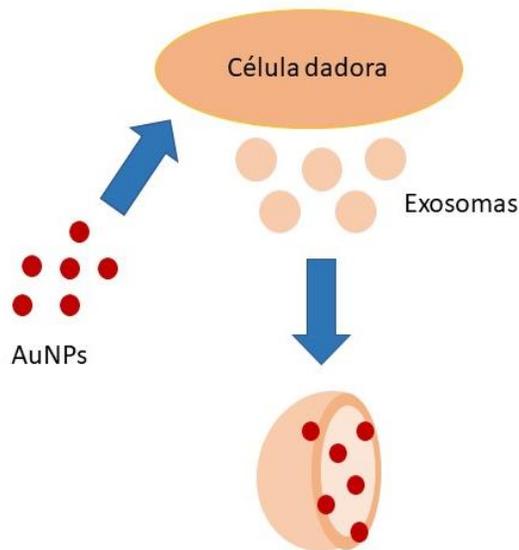


Figura 3.5. Esquema representativo de la estrategia para la inclusión de nanopartículas de oro en exosomas.

3.4.2.2. Aislamiento de exosomas con inclusión de nanopartículas de oro funcionalizadas por el método de ultracentrifugación (UC).

El aislamiento de las nanovesículas con inclusión de AuNPs se llevó a cabo según el protocolo de ultracentrifugación descrito anteriormente en la sección 3.4.1.4.1.

Previamente se descongeló el medio para aislamiento de exosomas con inclusión de AuNPs descrito en 3.4.2.1 y se centrifugó a 2.000 x g por 20 minutos a 4° C. Luego, el sobrenadante se centrifugó a 12.000 x g por 45 minutos a 4° C. Se recolectó nuevamente el sobrenadante y se filtró a través de filtros de PVDF de 0,22 µm bajo campana de flujo laminar. A continuación, el sobrenadante filtrado se ultracentrifugó a 110.000 x g por 2 horas a 4° C. Posterior a esto, se resuspendió el *pellet* resultante con PBS 1x y se realizó otra vez una ultracentrifugación a 110.000 x g por 2 horas a 4° C. Finalmente, se resuspendió el *pellet* que contiene los exosomas con AuNPs en 1 mL de PBS 1x y se almacenó a -80°C.

3.4.2.3. Aislamiento de exosomas con inclusión de nanopartículas de oro funcionalizadas por el *kit* comercial Exospin®.

Para realizar el aislamiento de exosomas con incorporación de AuNPs por el *kit* comercial Exospin® se utilizó el protocolo descrito en 3.4.1.4.2.

Para esto se descongeló el medio para aislamiento de exosomas con inclusión de AuNPs definido en el apartado 3.4.2.1 y se realizó una centrifugación a 300 x g por 10

minutos. Luego, el sobrenadante se centrifugó a 16.000 x g por 30 minutos y posteriormente el sobrenadante resultante se incubó con el “Buffer A” durante toda la noche. Transcurrido el tiempo, la mezcla se centrifugó a 16.000 x g por 60 minutos y el *pellet* que resultó se resuspendió en 100 μ L de PBS 1x. Posterior a esto, se cargó el *pellet* en una columna de Exospin® y se realizaron los pasos correspondientes descritos en 3.4.1.4.2. El volumen de 200 μ L que eluyó corresponde a exosomas con incorporación de AuNPs provenientes de la línea celular B16F10.

3.4.2.4. Caracterización de las nanovesículas con inclusión de nanopartículas de oro a partir de la línea celular B16F10.

Una vez obtenidos los exosomas con AuNP-PEG-FA o AuNP-PEG-R7CLPFFD a partir de diferentes métodos de aislamiento estos fueron caracterizados por las técnicas de dispersión dinámica de la luz (DLS), potencial Z, microscopía electrónica de transmisión (TEM) y *western blot*.

3.4.2.4.1. Dispersión dinámica de la luz y micro-electroforesis de láser Doppler.

Para evaluar el diámetro hidrodinámico (Dh), la dispersión de tamaño y la carga superficial de los exosomas se utilizó el equipo Malvern ZetaSizer Nano ZS. Para esto, se tomó una alícuota de 50 μ L de la muestra de exosomas por UC y se diluyó en 950 μ L de PBS 1x y para la muestra obtenida por Exospin® se tomó una alícuota de 20 μ L de muestra y se diluyó en 980 μ L de PBS 1x. Luego, se colocó cada dilución en una celda capilar desechable y se realizó un mínimo de tres mediciones por muestra. Los resultados se expresan en términos de diámetro hidrodinámico (Dh \pm SD), índice de polidispersión (Pdi) y potencial zeta (mV \pm SD).

3.4.2.4.2. Microscopía electrónica de transmisión (STEM).

Para observar la morfología y polidispersión de tamaño de los exosomas con inclusión de AuNPs estos fueron observados por microscopía electrónica de transmisión. Para esto se depositó cada muestra teñida con ácido fosfotúngstico al 0,5% sobre una rejilla de cobre de 200 mesh recubierta con el polímero *formvar*. Las rejillas se dejaron secar toda la noche y se observaron al microscopio FEI Inspect 50. Finalmente, se midieron 100 partículas en las micografías obtenidas empleando el programa ImageJ, posteriormente estos datos se representaron en histogramas de tamaño por número de exosomas (% Exosomas) vs diámetro.

3.4.2.4.3. Western blotting.

Para la detección de proteínas características de exosomas en las nanovesículas con incorporación de AuNPs se utilizó el protocolo anteriormente detallado en la sección 3.4.1.5.3.

En resumen, se realizó la cuantificación de proteínas de las muestras de exosomas con AuNPs por el método de microBCA según el protocolo del apartado 3.4.1.5.3.1. Posterior a esto, se preparó las muestras de exosomas con 50 µg de proteína total y se realizó un *western blot* según lo descrito en las secciones 3.4.1.5.3.2. al 3.4.1.5.3.6.

3.5. Evaluar la incorporación de las nanopartículas de oro funcionalizadas en exosomas aislados de la línea celular B16F10.

Para determinar la presencia de AuNPs en las nanovesículas aisladas se utilizaron las técnicas de espectrofotometría UV-visible y análisis por activación neutrónica (AAN).

3.5.1. Espectrofotometría UV-visible.

Se realizó espectrofotometría UV-visible para determinar el plasmón superficial característico de las AuNPs y así evidenciar su presencia. Para esto se midió las muestras de exosomas en una dilución de 1:5 con PBS 1x, en un rango de 400 a 700 nm de longitud de onda y se utilizó como blanco PBS 1x.

3.5.2. Activación neutrónica.

Para determinar el oro presente en los exosomas aislados se enviaron las muestras a la CCHEN, en donde el oro fue cuantificado a través de la técnica de AAN.

Para esto, se tomó una alícuota de 25 µL de cada muestra de exosomas, se evaporó el solvente con una lámpara infrarroja y se envió a la CCHEN para determinar la cantidad de oro de cada muestra.

Para la cuantificación de oro por AAN las muestras fueron selladas y expuestas por 17 horas a un flujo de neutrones de 0.25–1.3 n/cm²s con un poder de 5 mW gatillando así la conversión de ¹⁹⁷Au a ¹⁹⁸Au. Después de 7-12 días de bombardeo con neutrones, los rayos γ emitidos por las muestras fueron contados y separados por energía usando un detector de germanio acoplado a un espectrómetro multicanal de rayos γ acoplado a un computador. El espectro de rayos γ fue analizado usando el software SAMPO90 Canberra.

Los resultados de masa total de los elementos fueron determinados con su incertidumbre asociada, calculada con un factor de cobertura igual a 2, lo que equivale a aproximadamente a un nivel de confianza del 95%. Los resultados fueron expresados en Au totales (ng). Paralelo a esto, se cuantificó la cantidad de proteínas de las muestras enviadas por el kit de microBCA™ (apartado 3.4.1.5.3.1) para así posteriormente comparar la cantidad de oro por proteína de cada muestra.

3.6. Optimizar el aislamiento de exosomas con inclusión de nanopartículas de oro mediante kit comercial Exospin®.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo respecto a la cantidad de oro que poseen los exosomas con AuNPs aislados por Exospin® se realizó la modificación del protocolo de aislamiento descrito en 3.4.2.3.

Como se indica en la Figura 3.6. (A) para el método de Exospin® se realiza una centrifugación de 16.000 x g por 30 minutos, velocidad y tiempo a la cual las AuNPs precipitan. Es por lo anterior que en este paso podrían estar precipitando los exosomas que contienen AuNPs. Por ello se modificó el procedimiento y se continuó el aislamiento con el *pellet* resultante de la centrifugación en lugar del sobrenadante tal como se observa en la Figura 3.6. (B). El resto de los pasos se conservó según lo detallado anteriormente en el apartado 3.4.2.3.

En resumen, se descongeló el medio para aislamiento de exosomas con inclusión de AuNPs (ver sección 3.4.2.1.) y se realizó una centrifugación a 300 x g por 10 minutos. Luego, el sobrenadante se centrifugó a 16.000 x g por 30 minutos y el *pellet* resultante se incubó con el "Buffer A" durante toda la noche. Transcurrido el tiempo, la mezcla se centrifugó a 16.000 x g por 60 minutos y el *pellet* que resultó se resuspendió en 100 µL de PBS 1x. Posterior a esto, se aplicó el *pellet* a la columna de Exospin® y se realizaron los pasos descritos anteriormente en 3.4.2.3. El volumen de 200 µL que eluyó corresponde a exosomas con incorporación de AuNPs provenientes de la línea celular B16F10.

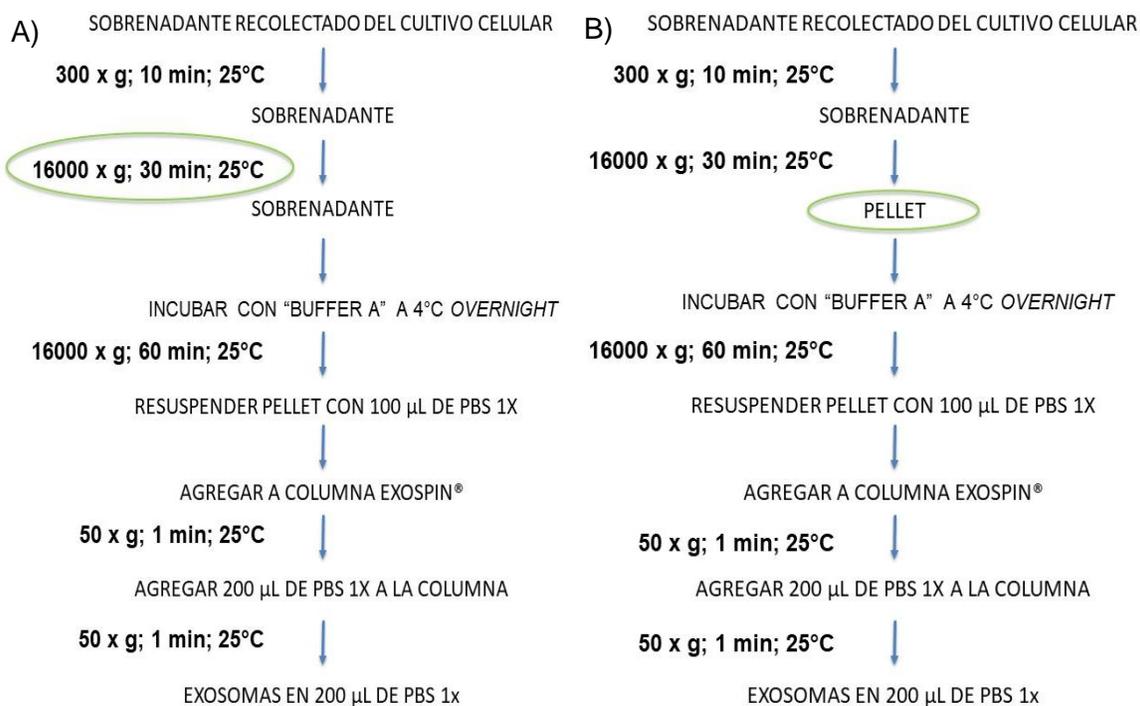


Figura 3.6. Protocolo de obtención de exosomas con AuNPs por (A) Exospin®, y su posterior modificación para optimizar el método de aislamiento (B) Exospin® modificado.

Seguido a esto, se realizó la caracterización de estos exosomas por dispersión dinámica de la luz, micro-electroforesis de láser Doppler, microscopía electrónica de transmisión y *western blotting* como se describe en la sección 3.4.2.4.

Finalmente, se evaluó la incorporación de las AuNPs en los exosomas por espectrofotometría UV-visible y activación neutrónica siguiendo las metodologías descritas en 3.5.1 y 3.5.2, respectivamente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtener y caracterizar nanopartículas de oro recubiertas con polietilenglicol (AuNP-PEG) y funcionalizadas con ácido fólico (AuNP-PEG-FA) y R7CLPFFD (AuNP-PEG-R7CLPFFD).

Las nanopartículas de oro (AuNPs) son candidatos interesantes para incluir en exosomas debido a sus útiles propiedades para terapia y diagnóstico descritas en 1.3. Para lograr la inclusión de las AuNPs en las nanovesículas, se utilizó como estrategia de incorporación la incubación de las AuNPs funcionalizadas con las células B16F10. Con esto se espera que las nanopartículas ingresen al interior de las células y que posteriormente se liberen en los exosomas.

Con el fin de favorecer la entrada de las AuNPs a las células B16F10, éstas se conjugaron con diferentes agentes que mejoren este proceso. En primer lugar, las nanopartículas de oro se recubrieron con polietilenglicol (PEG). Posteriormente se conjugaron con ácido fólico (FA) y con el péptido de penetración celular R7CLPFFD para favorecer el ingreso a las células B16F10.

La síntesis de las nanopartículas de oro recubiertas con citrato (AuNP-cit) se llevó a cabo por la reducción de la sal áurica HAuCl_4 siguiendo el protocolo de Levy y cols., 2004⁵⁸ detallado en la sección 3.1.1. Luego, las AuNP-cit se conjugaron con HS-PEG₅₀₀₀-OMe para estabilizar el nanosistema y HS-PEG₅₀₀₀-COOH para luego unir la molécula de interés a través del grupo carboxilo⁵⁹. Posterior a esto, se funcionalizó el nanosistema con ácido fólico o con el péptido R7CLPFFD para lograr mejorar la captación celular.

Finalmente, se caracterizaron los nanosistemas desarrollados por espectrofotometría UV-visible, dispersión dinámica de la luz, micro-electroforesis de láser Doppler y TEM según la metodología descrita en la sección 3.1.3.

Se determinó la banda del plasmón superficial de las AuNPs por espectrofotometría UV-visible. Las AuNPs poseen una banda de absorción característica y un máximo de absorción en la región verde del espectro visible cuando su tamaño está entre 10 a 40 nm³⁵. A partir de los resultados presentados en la Figura 4.1, se puede observar que todos los nanosistemas poseen una banda característica correspondiente al plasmón la cual se desplazó hacia el infrarrojo a medida que se realizaron las conjugaciones. En estudios anteriores, se ha determinado que el desplazamiento de la banda del plasmón a longitudes mayores es dependiente de múltiples factores⁶². Entre algunos están, el aumento del

tamaño de las nanoesferas, el cambio en las moléculas estabilizantes y la composición del medio dispersante⁶². Las AuNP-cit presentaron un máximo de absorción a 518 nm y mostraron un desplazamiento batocrómico a 521 nm al ser conjugadas con polietilenglicol. Este fenómeno se debe a la modificación de la superficie metálica por la quimisorción del polímero, el cual genera un cambio en el índice de refracción y consecuentemente el desplazamiento de la banda plasmónica. Asimismo, al realizar la modificación del nanosistema con ácido fólico y R7CLPFFD se observó un desplazamiento de la banda de absorción la cual podría explicarse debido a los múltiples factores anteriormente mencionados.

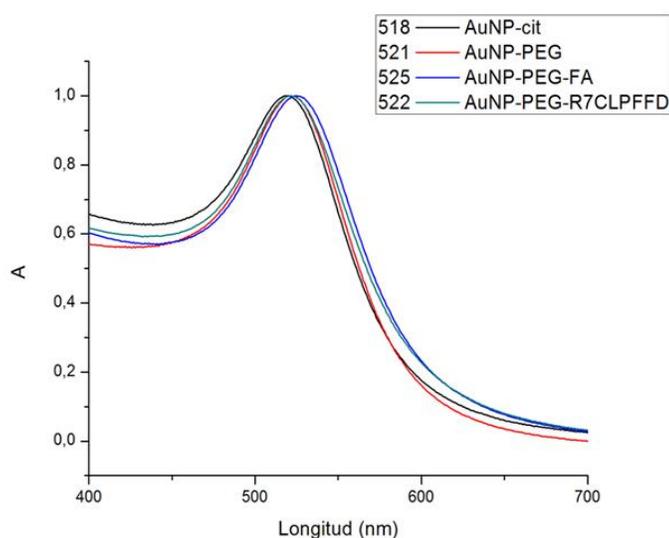


Figura 4.1. Espectro de absorción UV-visible de las AuNP-cit, AuNP-PEG-COOH/OMe, AuNP-PEG-FA y AuNP-PEG-R7CLPFFD.

Para evaluar el diámetro hidrodinámico (Dh) y la polidispersión de tamaños (Pdi) de los nanoconjugados se realizó DLS para cada uno de ellos. Los diámetros hidrodinámicos promedio de los nanosistemas fueron AuNP-cit $22 \pm 1,0$, AuNP-PEG-COOH/OMe $56 \pm 4,0$, AuNP-PEG-FA $64 \pm 5,0$ y AuNP-PEG-R7CLPFFD $65 \pm 10,0$ (Tabla 4.1). A partir de estos resultados, es posible observar que la conjugación de las nanopartículas aumenta el diámetro de las mismas. En el caso de la conjugación con PEG, el incremento de tamaño se debe a la quimisorción del polímero a la superficie de la nanopartícula a través de un enlace Au-S. Por otra parte, existen antecedentes de que la longitud de una molécula de PEG de 5000 Da completamente extendida es de 27 nm⁶³. Al considerar esto, se puede observar que el aumento de tamaño de las AuNP-cit fue relativamente cercano a esta magnitud, la cual puede variar debido a la flexibilidad del polímero⁶⁴. Asimismo, la funcionalización con ácido fólico y con R7CLPFFD generaron un aumento del diámetro

hidrodinámico el cual puede ser explicado por la unión de estos a los grupos carboxilos del polietilenglicol. Adicionalmente, se observó que los índices de polidispersión de los nanoconjugados (Tabla 4.1) fluctúan entre 0,2 y 0,3, lo cual es indicativo de que los nanosistemas desarrollados poseen poblaciones de tamaño homogéneas.

	Dh (nm) ± SD	Pdi
AuNP-cit	22 ± 1,0	0,2
AuNP-PEG-COOH/OMe	56 ± 4,0	0,2
AuNP-PEG-FA	64 ± 5,0	0,2
AuNP-PEG-R7CLPFFD	65 ± 10,0	0,3

Tabla 4.1. Diámetro hidrodinámico (Dh) promedio e índice de polidispersión (Pdi) de tamaños de AuNP-cit, AuNP-PEG-COOH/OMe, AuNP-PEG-FA y AuNP-PEG-R7CLPFFD por dispersión dinámica de la luz (DLS).

Por otra parte, el potencial Z entrega información respecto a la carga superficial de las nanopartículas en el sistema coloidal. Como se indica en la Tabla 4.2. la carga superficial de AuNP-cit, AuNP-PEG-COOH/OMe, AuNP-PEG-FA y AuNP-PEG-R7CLPFFD fue $-42 \pm 0,5$, $-28 \pm 3,0$, $-31 \pm 4,0$ y $14 \pm 12,0$, respectivamente. A partir de estos resultados se puede discutir respecto a la estabilidad de las nanopartículas en solución. Por ejemplo en el caso de las AuNP-cit se puede mencionar que la estabilidad coloidal está dada principalmente por la repulsión eléctrica que se produce entre las mismas partículas debido a su carga superficial. Por otra parte, el HS-PEG-OMe es una molécula que no posee cargas formales mientras que HS-PEG-COOH tiene sólo una carga negativa. Por lo tanto, al conjugar las AuNP-cit con PEG ocurre una disminución del valor absoluto de la carga superficial debido al desplazamiento del citrato que posee tres cargas negativas. Con respecto a la estabilidad de las AuNP-PEG-COOH/OMe esta es producida por el impedimento estérico que proporcionan las largas cadenas del polietilenglicol como también por la repulsión eléctrica de las partículas. Posterior a esto, la funcionalización con ácido fólico no generó una variación significativa en la carga superficial. Esto podría explicarse debido a que el ácido fólico posee dos grupos carboxilos, pero sólo uno se encuentra desprotonado a pH 7, por lo tanto, al unirse al PEG produciría prácticamente la misma carga. Por otra parte, en el caso del péptido R7CLPFFD este produjo una carga superficial positiva del nanosistema. Esto se debe a que el punto isoeléctrico de este péptido es aproximadamente 12,2, por lo tanto, a pH 7 las aminas que posee este péptido están protonadas lo cual confiere un

potencial zeta positivo. Cabe destacar que este valor positivo puede generar un aumento en la captación celular del nanosistema ya que se favorece la interacción con las membranas celulares que poseen cargas negativas. Respecto a la estabilidad de los sistemas con FA y R7CLPFFD, en ambos la estabilidad está dada por el impedimento estérico que producen las cadenas alrededor de la AuNPs y la repulsión de las partículas a causa de sus cargas.

	pZ (mV) ± SD
AuNP-cit	-42 ± 0,5
AuNP-PEG-COOH/OMe	-28 ± 3,0
AuNP-PEG-FA	-31 ± 4,0
AuNP-PEG-R7CLPFFD	14 ± 12,0

Tabla 4.2. Potencial zeta (mV) de AuNP-cit, AuNP-PEG-COOH/OMe, AuNP-PEG-FA y AuNP-PEG-R7CLPFFD determinado mediante micro electroforesis de láser Doppler (potencial zeta).

Finalmente, para determinar el tamaño y la morfología de las AuNPs las muestras se observaron por microscopía electrónica de transmisión (STEM). De esta manera cómo se indica en los histogramas de tamaño, el diámetro promedio de AuNP-cit, AuNP-PEG-COOH/OMe, AuNP-PEG-FA y AuNP-PEG-R7CLPFFD fue 12, 12, 11 y 13 nm, respectivamente (Figura 4.2). Es interesante mencionar que los tamaños observados por STEM son menores que los obtenidos por DLS (Tabla 4.1). Esto se explica debido a que por DLS se determina el diámetro hidrodinámico de la nanopartícula el cual considera la capa de hidratación y la presencia de iones adherida a la superficie de esta. Con respecto a la morfología y la dispersión de los nanosistemas se observó que todos poseen la misma forma y una población de tamaños homogénea entre las partículas lo cual concuerda con lo observado por DLS (Tabla 4.1).

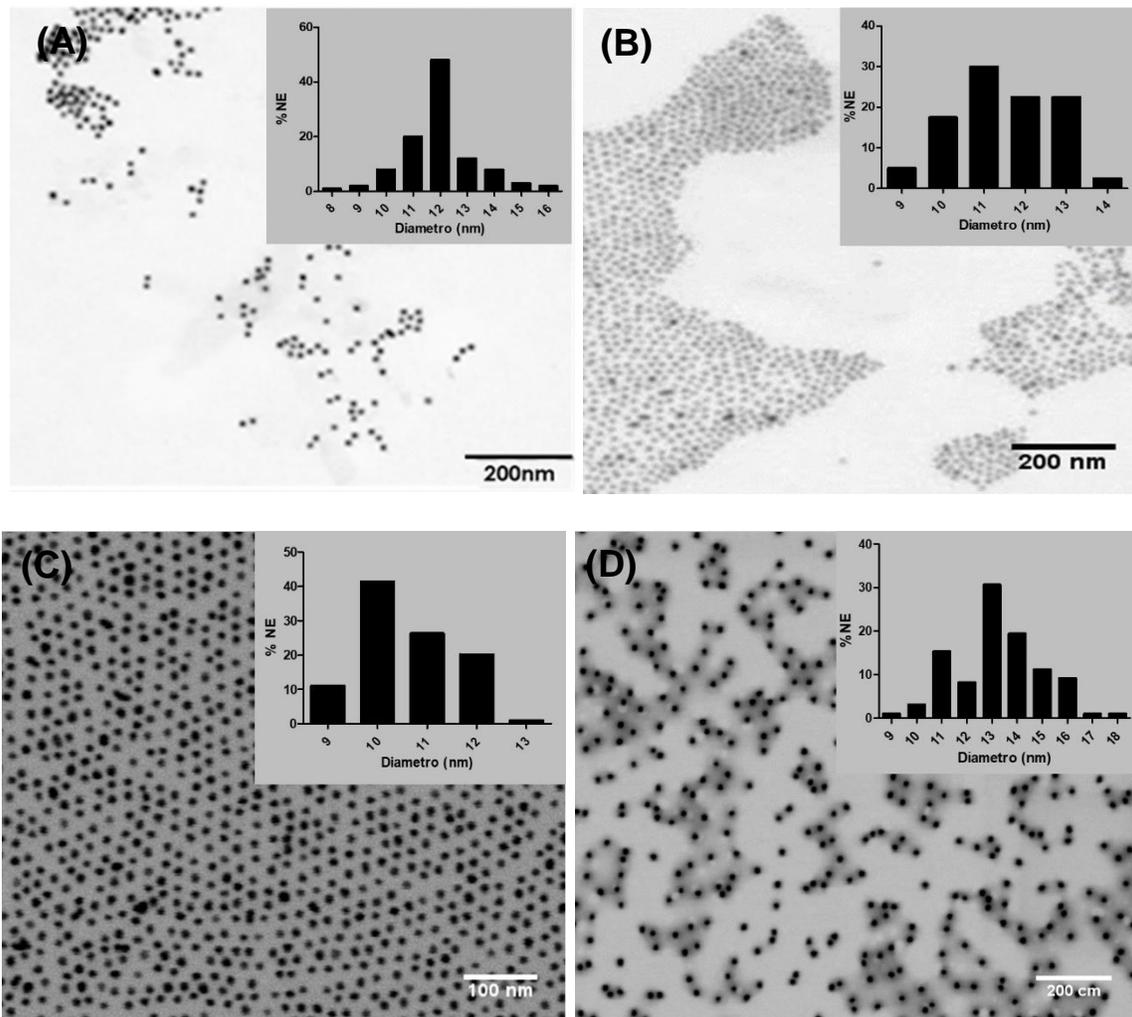


Figura 4.2. Micografías con su respectivo histograma de tamaños de (A) AuNP-cit, (B) AuNP-PEG-COOH/OMe, (C) AuNP-PEG-FA y (D) AuNP-PEG-R7CLPFFD por microscopía electrónica de transmisión.

4.2. Evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas de oro funcionalizadas en la línea celular B16F10.

Con el fin de evaluar la citotoxicidad de las AuNPs que se incubaron con las células B16F10 se realizó el ensayo colorimétrico de MTS. Este experimento se basa en la formación del compuesto coloreado formazán producto de la actividad enzimática mitocondrial de células vivas. Para esto se utilizaron las células B16F10 que se incubaron con soluciones de nanopartículas AuNP-PEG-FA o AuNP-PEG-R7CLPFFD de concentraciones de 0,1, 1, 2 y 4 nM por 24 horas. Además, se realizaron controles con células incubadas en medio RPMI con 1% de SFB (control), con SDS al 20% (control de muerte) y con agua Milli-Q (control de vehículo).

Con respecto a las AuNP-PEG-FA se puede concluir que todas las concentraciones evaluadas no presentaron toxicidad en las células B16F10 a las 24 horas de incubación (Figura 4.3). Esto se explica a partir de que no existen diferencias significativas entre el porcentaje (%) de viabilidad del control de vida y de las células que fueron tratadas con las AuNPs. Según lo anterior, se puede concluir que la incubación con las diferentes concentraciones de AuNP-PEG-R7CLPFFD por 24 horas tampoco provocó efectos sobre la viabilidad celular (Figura 4.3). Cabe destacar que en ambos casos sólo se observaron diferencias significativas entre el control de vida y de vehículo con las células tratadas con SDS al 2%.

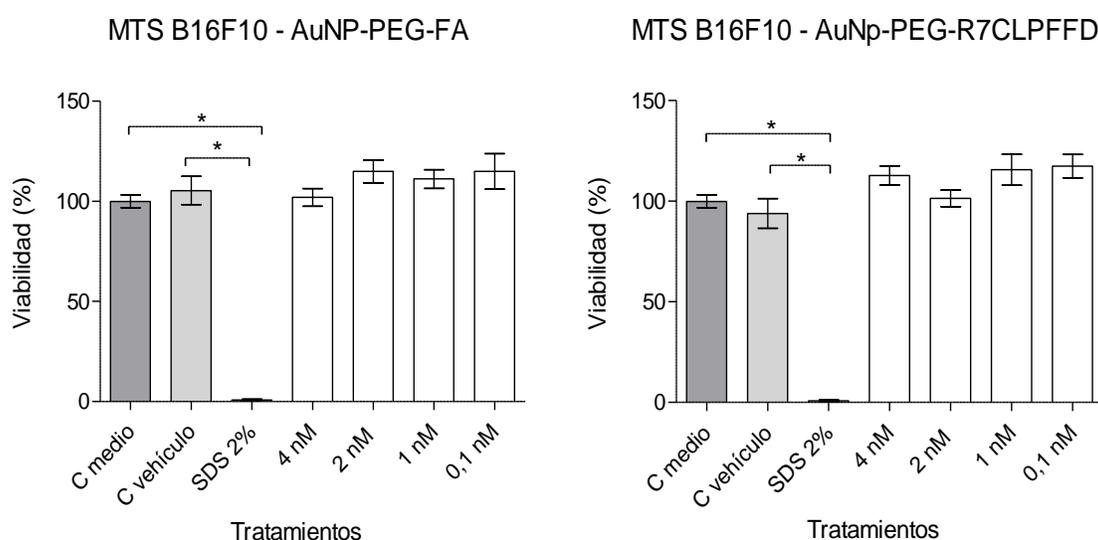


Figura 4.3. Evaluación de la citotoxicidad de diferentes concentraciones de (A) AuNP-PEG-FA y (B) AuNP-PEG-R7CLPFFD en la línea celular B16F10 a través del ensayo colorimétrico MTS. Los datos fueron analizados por ANOVA, Tukey (* $P < 0,05$ respecto a los controles, $n=3$).

4.3. Evaluar *in vitro* la penetración celular de las nanopartículas de oro funcionalizadas en la línea celular B16F10.

Con el propósito de evaluar la penetración celular de las AuNPs en las células B16F10, lo cual es clave en la estrategia de incorporación de las AuNPs en exosomas, se realizaron diferentes experimentos.

Primero, se evaluó la captación/adherencia de las AuNPs en B16F10 a través de su plasmón superficial por espectrofotometría UV-visible. Para esto se incubaron las células B16F10 con AuNP-PEG-FA ó AuNP-PEG-R7CLPFFD 10 nM a tiempos de 4 y 6 horas. Transcurrido el tiempo, se retiró el medio de cultivo y se determinó la intensidad en el

máximo de absorbancia correspondiente al plasmón por espectroscopía UV-visible. Finalmente, se analizaron los resultados para determinar la concentración de AuNPs en el sobrenadante y así determinar la cantidad captada/adherida en las células.

A partir de los resultados presentados en la Figura 4.4 se puede observar que las AuNP-PEG-FA presentan un mayor porcentaje de captación/adherencia que las AuNP-PEG-R7CLPFFD el cual es estadísticamente significativo. Por otro lado, las AuNP-PEG-FA a las 6 horas de incubación son más captadas/adheridas que a las 4 horas por las células B16F10. Adicionalmente, en el caso de las AuNP-PEG-R7CLPFFD no se observa una diferencia significativa entre la incubación a las 4 y a las 6 horas. A partir de esto definimos el tiempo óptimo de incubación de las AuNPs con la línea celular B16F10 a las 6 horas.

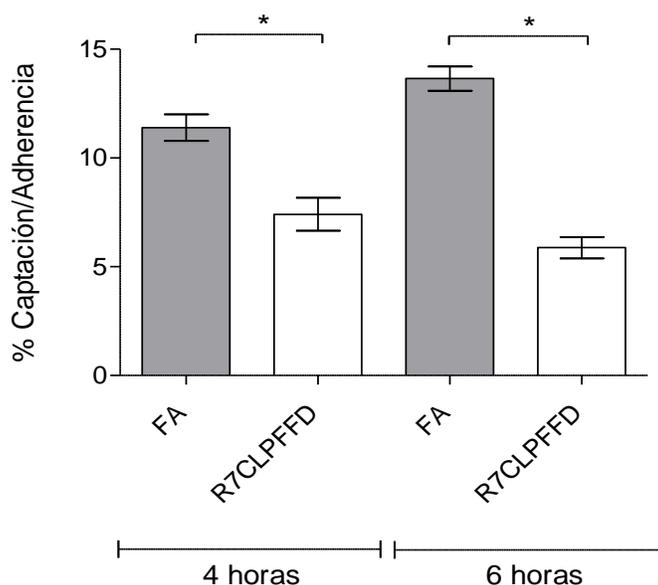


Figura 4.4. Evaluación de la captación/adherencia celular de AuNP-PEG-FA y AuNP-PEG-R7CLPFFD 1 nM en células B16F10 a tiempos de incubación de 4 y 6 horas por espectrofotometría UV-visible. Los datos presentan su respectiva desviación estándar y fueron analizados por ANOVA, Tukey (* $P < 0,05$ respecto a los controles, $n=2$).

Por otro lado, se realizó microscopía confocal para observar la internalización de AuNP-PEG-R7CLPFFD en la línea celular B16F10 a diferentes tiempos. Primero, se conjugaron las AuNP-PEG-R7CLPFFD con el fluoróforo Alexa₆₄₇ para poder realizar el seguimiento de las nanopartículas por fluorescencia. A continuación, se incubaron las células B16F10 con las AuNP-PEG-R7CLPFFD-Alexa₆₄₇ por 2 y 6 horas. Pasado el tiempo, se fijaron con paraformaldehído (PAF) y se marcó el núcleo celular. Además, se realizó un

control de células sin ser incubadas con AuNPs. Posteriormente se montaron las muestras y se observaron por microscopía confocal.

A partir de las imágenes de las Figura 4.5 se puede observar la presencia de las AuNP-PEG-R7CLPFFD-Alexa₆₄₇ (rojo) en las células B16F10 a las 2 y 6 horas de incubación respecto del control. Además, se puede observar que a las 6 horas de incubación la cantidad de AuNPs es mayor con respecto a las 2 horas. A la vez se puede observar que las AuNP-PEG-R7CLPFFD a las 6 horas de incubación se encuentran más próximas al núcleo de la célula (azul).

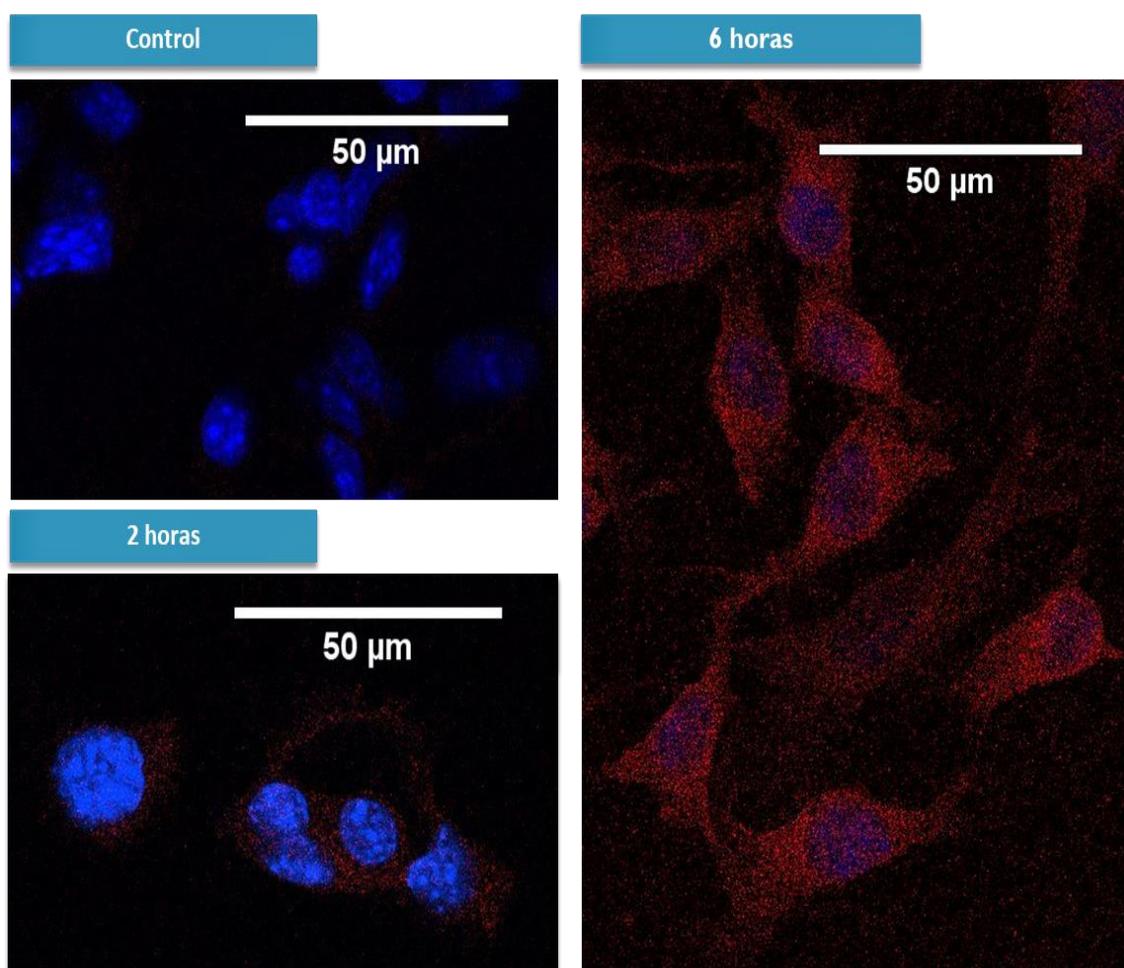


Figura 4.5. Evaluación de la captación celular de AuNP-PEG-R7CLPFFD-Alexa₆₄₇ 1 nM en células B16F10 a tiempos de incubación de 2 y 6 horas a 37° C y 5% de pCO₂ mediante microscopía confocal.

Finalmente, se determinó la cantidad de oro internalizada/adherida por las células B16F10 a través de análisis por activación neutrónica realizado en la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN). Primero, se incubaron las células B16F10 con AuNP-PEG-FA ó AuNP-PEG-R7CLPFFD 1 nM a los tiempos de 2 horas, 4 horas, 6 horas y 24 horas. Transcurrido el tiempo se agregó tripsina 1x para despegar las células de la placa y así ser posteriormente recolectadas. Finalmente, estas alícuotas fueron enviadas a la CCHEN donde fueron tratadas para cuantificar el oro a mediante análisis por activación neutrónica (AAN).

A partir de los resultados presentados en la Figura 4.6 se puede observar en las AuNP-PEG-FA que mientras mayores son los tiempos de incubación la cantidad de oro internalizada también aumenta. Mientras que en el caso de las AuNP-PEG-R7CLPFFD no se muestran diferencias significativas en la cantidad de oro internalizada entre las 2-6 horas. Cabe destacar que en ambos casos la mayor cantidad de oro captada por las células B16F10 fue a las 24 horas de incubación.

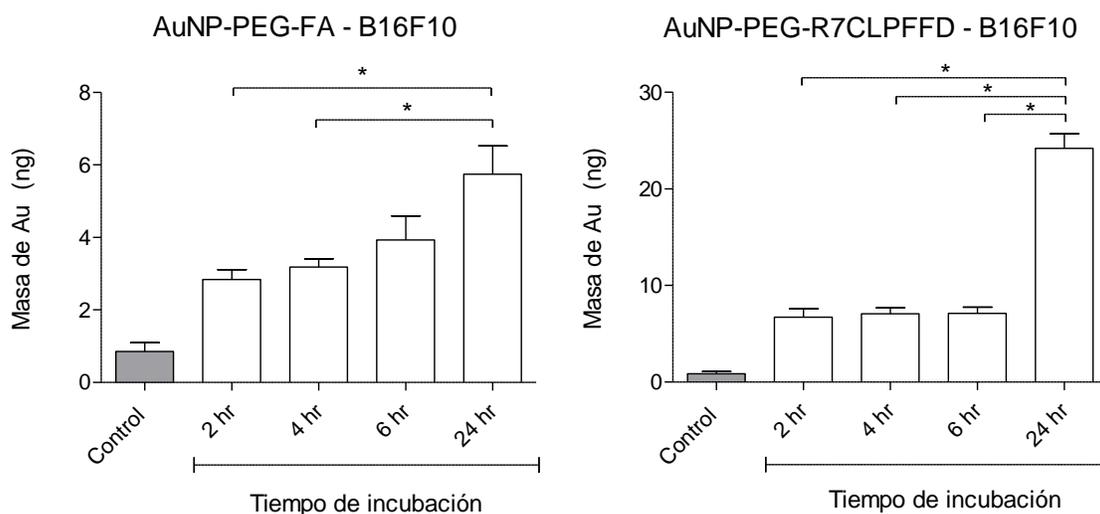


Figura 4.6. Evaluación de la captación/adherencia celular de AuNP-PEG-FA y AuNP-PEG-R7CLPFFD 1 nM en células B16F10 a tiempos de incubación de 2, 4, 6 y 24 horas mediante activación neutrónica. Los datos presentan su respectiva desviación estándar y fueron analizados por ANOVA, Tukey (* $P < 0,05$ respecto a los controles, $n=3$).

4.4. Aislar y caracterizar exosomas con inclusión de nanopartículas de oro funcionalizadas desde la línea celular B16F10.

4.4.1. Aislar y caracterizar exosomas desde la línea celular B16F10.

Los exosomas son vesículas endógenas con un gran potencial para *drug delivery* debido a las múltiples ventajas mencionadas en la sección 1.2. Nuestra propuesta es utilizar las células B16F10 para la producción de exosomas ya que existe evidencia de que las nanovesículas provenientes de esta línea celular poseen tropismo hacia el pulmón^{14,23}.

En primer lugar, con el fin de obtener exosomas desde la línea celular B16F10 se planteó como métodos de aislamiento la ultracentrifugación y el uso del *kit* comercial Exospin®.

Por una parte, se realizó el aislamiento de exosomas por el método de ultracentrifugación (UC), en el cual la separación de las nanovesículas ocurre en función del tamaño y la densidad. Para esto se utilizó el protocolo de la sección 3.4.1.4.1 en el cual se realizaron sucesivas centrifugaciones para eliminar los restos celulares y luego se separaron los orgánulos más pequeños por ultracentrifugación.

Por otro lado, se empleó el *kit* comercial Exospin® el cual se basa en el uso de columnas de exclusión por tamaño. Para esto se llevó a cabo el protocolo descrito en 3.4.1.4.2 en el cual se realizan sucesivas centrifugaciones y luego se incubó el sobrenadante con “buffer A” durante toda la noche. A continuación, se utilizó la columna de exclusión provista por el *kit* comercial Exospin®.

Finalmente, las nanovesículas obtenidas por ambos métodos se caracterizaron por DLS, micro-electroforesis de láser Doppler, STEM y *western blotting* como se indica anteriormente en la sección 3.4.1.5.

Para determinar el diámetro hidrodinámico (Dh) y el índice de polidispersión (Pdi) de los exosomas se utilizó dispersión dinámica de la luz (DLS). Las vesículas aisladas por UC presentaron un Dh promedio de $122 \pm 4,0$ nm y un Pdi de 0,4 mientras que por Exospin® se observó un Dh de $127 \pm 30,0$ nm y un Pdi de 0,7 (Tabla 4.3). A partir de esto, se puede concluir que ambos métodos permiten aislar partículas dentro del rango de tamaño de exosomas registrado en literatura el cual está entre 30-200 nm⁷. Sin embargo, la ultracentrifugación presenta un índice de polidispersión menor, el cual indica que produce una población más homogénea en tamaño.

Además, se evaluó la carga superficial de los exosomas por micro electroforesis de láser Doppler. Las nanovesículas aisladas por ultracentrifugación y por Exospin® presentaron una carga superficial de $-18 \pm 1,0$ mV y $-17 \pm 2,0$ mV respectivamente (Tabla 4.3). En este caso, los valores obtenidos concuerdan con lo reportado anteriormente en literatura, donde los exosomas suspendidos en PBS 1x poseen una carga superficial promedio de -16 mV⁷. En general, la estabilidad coloidal de formulaciones nanométricas es determinada por la carga superficial, en el cual valores $\geq +30$ ó -30 mV son considerados suspensiones coloidales muy estables⁷. No obstante, debe considerarse que la estabilización de las nanopartículas también puede deberse a los efectos estéricos dados por las proteínas que se encuentran en las membranas lipídicas de las nanovesículas.

	Dh (nm) \pm SD	Pdi	pZ (mV) \pm SD
Ultracentrifugación	122 \pm 4,0	0,4	-18 \pm 1,0
Exospin	127 \pm 30,0	0,7	-17 \pm 2,0

Tabla 4.3. Datos tabulados de diámetro hidrodinámico (Dh), índice de polidispersión (Pdi) y carga superficial (pZ) de exosomas aislados por el método de ultracentrifugación y Exospin®.

Por otro lado, se observó la morfología de las nanovesículas por microscopía electrónica de transmisión (STEM). En la figura 4.7 podemos ver exosomas provenientes desde la línea celular B16F10 aislados por el método de ultracentrifugación (A) y por Exospin® (B). En ambas micrografías se puede observar que la mayoría de las partículas poseen una forma vesicular y tamaños entre los 60 y 200 nm. Al igual que lo observado por DLS, las dimensiones están dentro del rango de tamaño registrado en literatura (30 a 200 nm)⁷. Además, los histogramas de cada micrografía indican que en el caso de los exosomas por ultracentrifugación la mayoría de las partículas posee un diámetro sobre los 100 nm. Mientras, en el caso de los exosomas por Exospin, la mayoría de las partículas son menores a los 100 nm. Asimismo, podemos ver que los exosomas aislados por Exospin® (B) presentan poblaciones de tamaño más heterogéneas que los exosomas obtenidos por ultracentrifugación (A) lo cual concuerda con el Pdi obtenido anteriormente por DLS (Tabla 4.3).

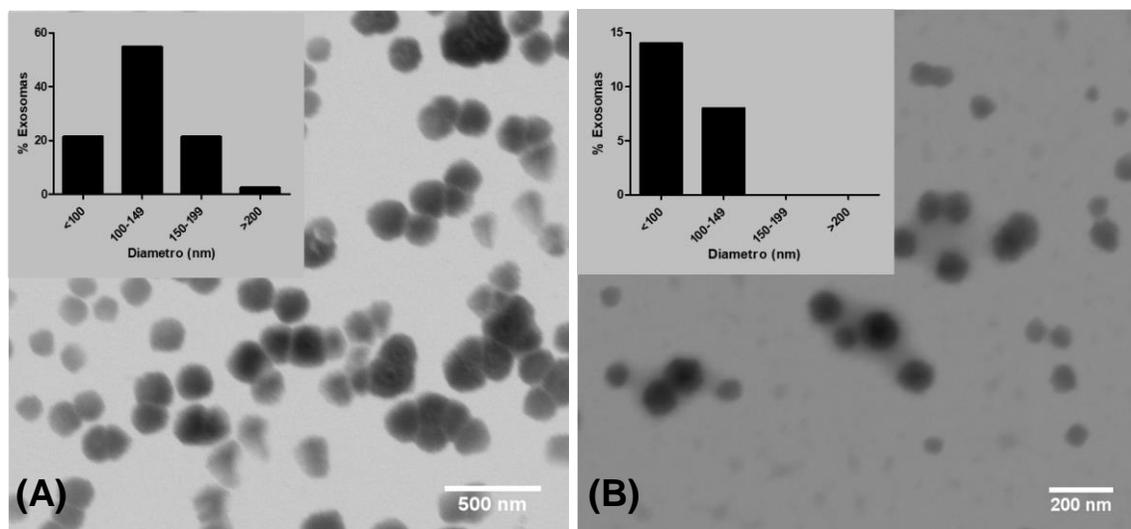


Figura 4.7. Micrografías con su respectivo histograma de tamaños de exosomas aislados desde la línea celular B16F10 por Ultracentrifugación (A) y por Exospin® (B) mediante microscopia electrónica de transmisión.

Finalmente, las muestras de exosomas aislados se analizaron por *western blotting* para detectar proteínas involucradas en la biogénesis de estas nanovesículas. Para esto se evaluó la presencia de la proteína TSG101 y la ausencia de Calnexina. Como se indica en (B) y (C) de la Figura 4.12, en ambas muestras de exosomas se detectó la presencia de proteínas que se encuentran involucradas en la formación de los exosomas⁹. Por otra parte, la calnexina es una proteína del retículo endoplásmico por lo tanto no debe estar presente en exosomas⁶⁵. Como se observa en la Figura 4.12 esta proteína no está presente en las muestras de exosomas aislados (B y C) pero si se encontró en el lisado de las células B16F10 (A). A partir de estos resultados se puede concluir que en las muestras obtenidas a través de los diferentes métodos existe la presencia de exosomas.

4.4.2. Aislar y caracterizar exosomas con inclusión de nanopartículas de oro funcionalizadas desde la línea celular B16F10.

El principal propósito de este proyecto es la obtención de exosomas con inclusión de AuNPs. Entre los objetivos de este nanosistema está poder dirigir la llegada de las AuNPs al pulmón y así emplear las propiedades que poseen las AuNPs para terapia y diagnóstico.

El aislamiento de los exosomas con AuNPs se realizó a partir de la línea celular de melanoma B16F10. Para esto, se dejaron incubar las células B16F10 con las AuNP-PEG-FA ó AuNP-PEG-R7CLPFFD 10 nM por 6 horas. Posteriormente, se retiró el medio y se dejó las células con medio RPMI completo *exo-free* por 24 horas. Pasado el tiempo, se recolectó el medio y se almacenó a - 80° C. Más adelante se realizó el aislamiento de los exosomas por el método de ultracentrifugación (descrito en la sección 3.4.1.4.1) o mediante el kit comercial Exospin® (sección 3.4.1.4.2). Finalmente, las muestras de exosomas obtenidas por ambos protocolos se caracterizaron por dispersión dinámica de la luz (DLS), micro electroforesis de láser Doppler (potencial Z), microscopía electrónica de transmisión (STEM) y *western blotting*.

Para evaluar el diámetro hidrodinámico y la dispersión de tamaños de los exosomas con AuNPs se realizó DLS. A partir de los resultados de la Tabla 4.4 podemos observar que los exosomas obtenidos por UC y por Exospin® presentaron Dh entre 30-200 nm tal como se describe anteriormente en literatura⁷. Sin embargo, en el caso de los exosomas con AuNP-PEG-R7CLPFFD obtenidos por Exospin® se observó un diámetro hidrodinámico significativamente inferior al resto de los sistemas con AuNPs. Cabe destacar que el resto de los sistemas presentaron un diámetro hidrodinámico similar a los exosomas sin inclusión de AuNPs presentados en la Tabla 4.3. Esto podría dar cuenta que la incorporación de las nanopartículas a las vesículas no genera una alteración significativa en su tamaño. Por otra parte, como se observa en la Tabla 4.4 el índice de polidispersión (Pdi) de los exosomas aislados por UC (0,3 y 0,3) es menor en ambos casos a los obtenidos por Exospin® (0,6 y 0,7). Estos resultados indican que el método de ultracentrifugación nos entrega nanosistemas con una población de tamaño más homogénea que el kit comercial.

Método de aislamiento	AuNPs incorporadas	Dh (nm) ± SD	Pdi	pZ (mV) ± SD
Ultracentrifugación (UC)	AuNP-PEG-FA	133 ± 22,0	0,3	-16 ± 4,0
	AuNP-PEG-R7CLPFFD	165 ± 17,0	0,3	-14 ± 4,0
Exospin®	AuNP-PEG-FA	112 ± 23,0	0,6	-13 ± 3,0
	AuNP-PEG-R7CLPFFD	65 ± 3,0	0,7	-13 ± 1,0

Tabla 4.4. Datos tabulados de diámetro hidrodinámico (Dh), índice de polidispersión (Pdi) y carga superficial (pZ) de exosomas con incorporación de AuNP-PEG-FA ó AuNP-PEG-R7CLPFFD aislados por el método de ultracentrifugación y Exospin®.

Además, se determinó la carga superficial (pZ) de los exosomas con inclusión de AuNPs mediante micro electroforesis de láser Doppler. Según lo observado en la Tabla 4.4 la carga superficial de los exosomas obtenidos fue relativamente diferente a los exosomas sin AuNPs (Tabla 4.3). Esto podría ser explicado debido a la incorporación de las nanopartículas de oro las cuales poseen carga superficial propia.

Por otro lado, se observó la morfología y la polidispersión de tamaños de los exosomas con AuNPs por microscopía electrónica de transmisión. En la Figura 4.8 podemos observar las micrografías de exosomas con inclusión de AuNPs aislados por ultracentrifugación (A) y por Exospin® (B y C). En las imágenes (A, B y C) podemos observar que las partículas poseen una forma vesicular y tamaños entre los 30-200 nm al igual que los exosomas sin AuNPs (Figura 4.7). Estos resultados indicarían que la incorporación de las nanopartículas no altera la morfología y tamaño de las vesículas. Además, los histogramas de cada micrografía indican que la mayoría de los partículas de las muestras de exosomas por ultracentrifugación y por Exospin poseen un diámetro sobre los 100 nm. Adicionalmente, los exosomas aislados por Exospin® (B y C) presentaron poblaciones de tamaño más heterogéneas que los obtenidos por ultracentrifugación (A) lo cual concuerda con el Pdi que se observó previamente por DLS.

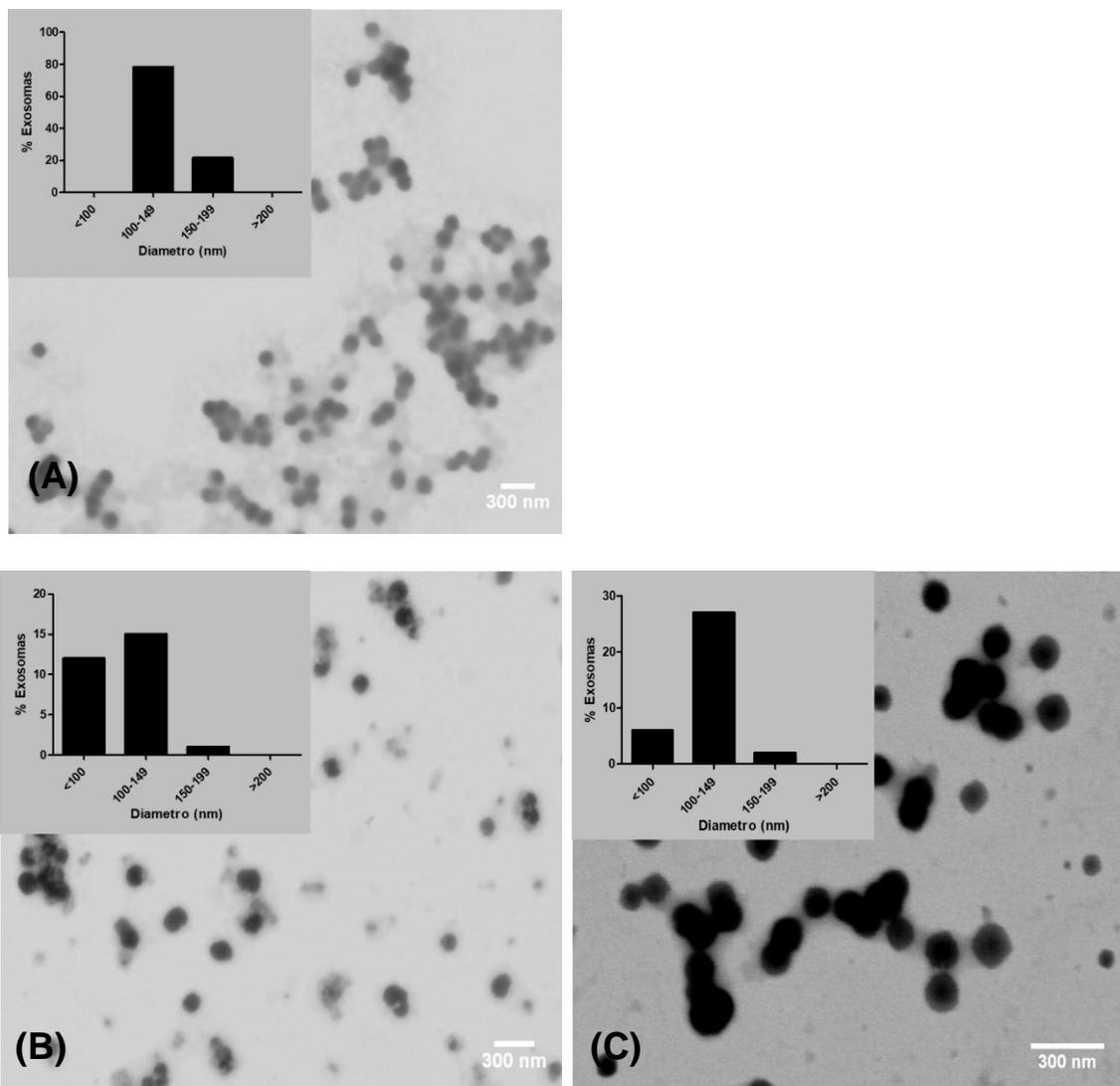


Figura 4.8. Micrografías con su respectivo histograma de tamaños de exosomas con AuNPs aislados desde la línea celular B16F10 por ultracentrifugación (A) y por Exospin® (B y C) mediante microscopía electrónica de transmisión.

Finalmente, se analizaron las muestras de exosomas con AuNPs mediante *western blotting* para detectar proteínas características de estas nanovesículas. Para esto se realizó el experimento según lo descrito en el apartado 3.4.1.5.3. y se utilizaron los anticuerpos de las proteínas TSG101 y Calnexina (control negativo). En el caso de las vesículas obtenidas por UC (Figura 4.12 (F)) podemos observar que los exosomas con AuNP-PEG-FA presentan la proteína TSG101 la cual es característica de estas nanovesículas debido a que está involucrada en la formación de las mismas. Por otra parte, en los exosomas con AuNP-PEG-R7CLPFFD (Figura 4.12 (D)) se detectó la presencia de la proteína TSG101 pero en menor medida que respecto al resto. Asimismo, ambos nanosistemas mostraron

ausencia de Calnexina la cual es una proteína del retículo endoplásmico que no debe estar presente en exosomas. A partir de estos resultados se podría concluir que en las muestras obtenidas por UC existe presencia de exosomas. Por otra parte, se evaluaron las muestras de exosomas obtenidas por Exospin®. Según lo que se muestra en la Figura 4.12 en los *western blot* correspondientes a los exosomas con AuNP-PEG-FA (H) se evidencia la presencia de la proteína TSG101, sin embargo, no así en las nanovesículas con AuNP-PEG-R7CLPFFD (I). Además, se observa que ambas muestras no se encuentra la proteína Calnexina. A partir de la ausencia de la proteína TSG101 podríamos decir que el método de Exospin® no entregó muestras con exosomas en el caso de AuNP-PEG-R7CLPFFD. Cabe destacar que el lisado de células B16F10 (Figura 4.12 (A)) presenta la proteína de retículo endoplásmico Calnexina.

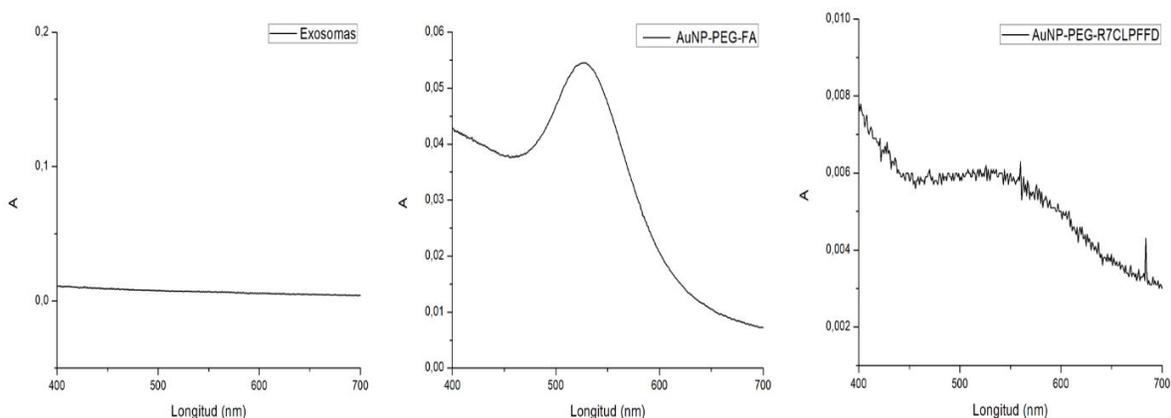
4.5. Evaluar la incorporación de las nanopartículas de oro funcionalizadas en los exosomas aislados de la línea celular B16F10.

Finalmente, es necesario determinar si existe la presencia de oro en los exosomas aislados con incorporación de AuNPs. Para llevar a cabo este propósito se utilizó las técnicas de espectrofotometría UV-visible y análisis por activación neutrónica.

Primero, se realizó espectrofotometría UV-visible para determinar el plasmón superficial característico de las AuNPs y así evidenciar su presencia. Para esto se midió la muestra obtenida por ultracentrifugación o Exospin® en el espectrofotómetro, en un rango de 400 a 700 nm de longitud de onda y se utilizó como blanco PBS 1x.

A partir de los resultados de la Figura 4.9 se puede observar que los exosomas con nanopartículas obtenidos a través de ultracentrifugación presentan este pico característico de las AuNPs alrededor de los 500 nm de longitud. En el caso de los exosomas a partir de las células B16F10 sin incubación con AuNPs no presentaron este pico de absorción. Podemos observar que los exosomas con AuNP-PEG-FA tienen una absorbancia mayor que con AuNP-PEG-R7CPFFD lo que podría dar cuenta que existe una mayor cantidad de oro. Por otro lado, los exosomas que se obtuvieron por el *kit* comercial no presentaron este pico característico por lo que se podría concluir que en estas muestras no hay suficientes AuNPs para lograr ser detectadas por espectrofotometría UV-visible. Por lo tanto, sólo se pudo determinar la presencia de AuNPs a través de espectroscopía UV-visible en los exosomas aislados por ultracentrifugación.

(A) Ultracentrifugación.



(B) Exospin.

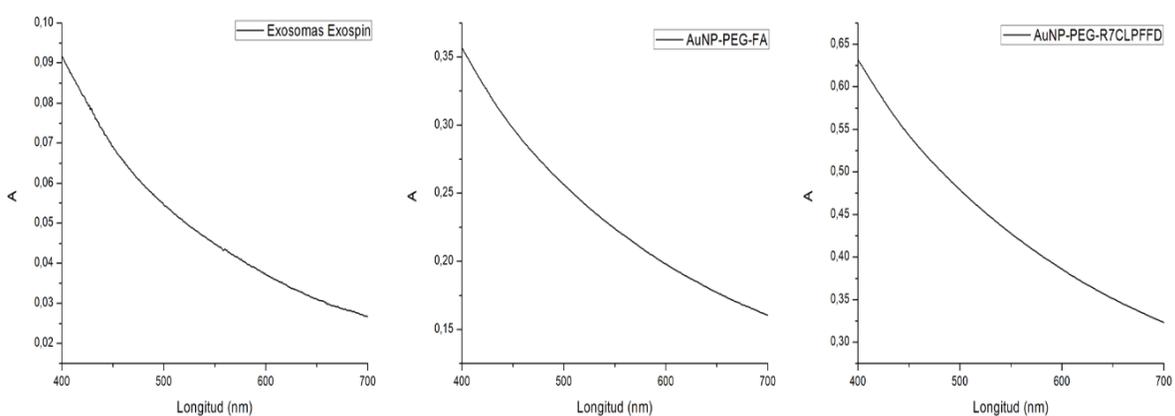


Figura 4.9. Espectros de absorción UV-visible de exosomas y exosomas con incorporación de AuNPs por (A) Ultracentrifugación y (B) Exospin.

Con el fin de cuantificar la cantidad de oro que existe en las muestras de exosomas con incorporación de AuNPs se realizó análisis por activación neutrónica en la CCHEN. Para esto, se tomó una alícuota de 25 μL de cada muestra, se evaporó el solvente con una lámpara infrarroja y se envió las muestras a la CCHEN para determinar la cantidad de oro.

Como se puede observar en la Figura 4.10 los exosomas con AuNP-PEG-FA y AuNP-PEG-R7CLPFFD obtenidos por ultracentrifugación poseen 3500 y 2240 nanogramos (ng) de oro, respectivamente. Mientras que el control el cual consiste en exosomas desde células B16F10 sin incubación con AuNPs presentaron 9,5 ng de oro. Por otro lado, los

exosomas aislados por *kit* comercial con AuNP-PEG-FA y AuNP-PEG-R7CLPFFD poseen 95 y 12 ng de oro; mientras el control presentó 9 ng. A partir de estos resultados se puede concluir que los exosomas que se obtienen por método de UC poseen una mayor cantidad de oro que los obtenidos por Exospin®. Esto concuerda con lo observado anteriormente por espectrofotometría UV-visible, en el cual se pudo detectar la presencia de AuNPs en las muestras obtenidas por UC, pero no en las aisladas por Exospin®.

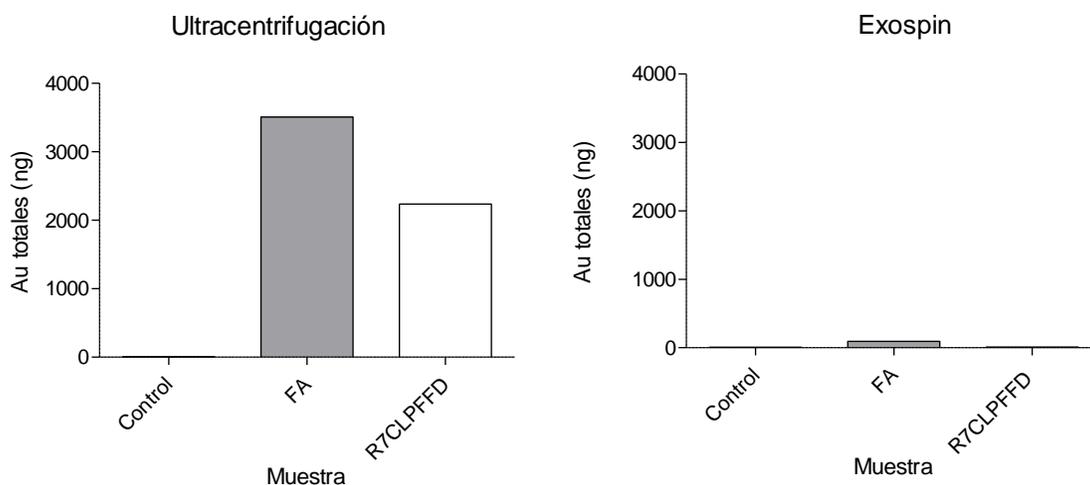


Figura 4.10. Cantidad de oro (ng) por cada 100 µg de proteínas de exosomas con incorporación de AuNPs aislados por ultracentrifugación y Exospin determinada mediante activación neutrónica. El experimento fue realizado con un n = 1.

4.6. Optimizar el aislamiento de exosomas con inclusión de nanopartículas de oro mediante kit comercial Exospin®.

A partir de los resultados presentados en la sección 4.5 podemos observar que la cantidad de oro de los exosomas con AuNPs aislados por Exospin® es significativamente menor a los obtenidos por UC. Debido a esto, se realizó la modificación del protocolo de aislamiento por Exospin® descrito en el apartado 3.4.2.3.

Como se indica en la sección 3.4.2.3 el procedimiento para aislar exosomas posee una centrifugación a 16.000 x g por 30 minutos en la cual podrían estar precipitando los exosomas con AuNPs. Posteriormente, este *pellet* resultante es descartado, por lo que podríamos estar desechando las nanovesículas presentes en la muestra. A partir de esto, se modificó el protocolo y se realizó el aislamiento con el *pellet* resultante en lugar del sobrenadante tal como se describe en la sección 3.6 (Figura 3.6 (B)).

Posteriormente, se realizó la caracterización de estos exosomas por dispersión dinámica de la luz, micro-electroforesis de láser Doppler, microscopía electrónica de transmisión y *western blot* según lo descrito en 3.4.1.5.

Con el fin de determinar el diámetro hidrodinámico y la dispersión de tamaños de los exosomas con AuNPs por Exospin modificado se realizó DLS. Como se detalla en la Tabla 4.5 los exosomas con AuNP-PEG-FA y AuNP-PEG-R7CLPFFD presentaron un Dh según lo descrito en literatura el cual está entre 30-200 nm⁷. A la vez se puede evidenciar que los exosomas con AuNP-PEG-R7CLPFFD no presentaron un Dh significativamente menor al resto de los sistemas como se observó en los resultados anteriores con Exospin® (Tabla 4.4). Por otra parte, el índice de polidispersión (Pdi) de los exosomas aislados por Exospin® modificado fueron 0,4 y 0,7. Estos resultados nos indican que, a pesar de la modificación del método, la UC entrega nanosistemas con una población de tamaño más homogénea que el kit comercial.

Además, se determinó la carga superficial (pZ) de estos exosomas mediante micro electroforesis de láser Doppler. Según lo observado en la Tabla 4.5 la carga superficial de los exosomas obtenidos con AuNP-PEG-FA y AuNP-PEG-R7CLPFFD fue $-18 \pm 1,0$ y $-17 \pm 2,0$ mV, respectivamente. Estos valores obtenidos son similares a los discutidos en literatura en el cual los exosomas suspendidos en PBS poseen una carga superficial promedio de -16 mV⁷.

AuNPs incorporada	Dh (nm) \pm SD	Pdi	pZ (mV) \pm SD
AuNP-PEG-FA	122 \pm 4,0	0,4	-18 \pm 1,0
AuNP-PEG-R7CLPFFD	127 \pm 30,0	0,7	-17 \pm 2,0

Tabla 4.5. Datos tabulados de diámetro hidrodinámico (Dh), índice de polidispersión (Pdi) y carga superficial (pZ) de exosomas con incorporación de AuNP-PEG-FA ó AuNP-PEG-R7CLPFFD aislados por el método de Exospin® modificado.

Además, se observó la morfología y la polidispersión de tamaños por microscopía electrónica de transmisión. Como se observa en la Figura 4.11 los exosomas con AuNP-PEG-FA poseen una forma vesicular y tamaños entre 100 y 200 nm. Asimismo, el histograma de la micrografía indica que la mayoría de las partículas poseen tamaños mayores a los 100 nm.

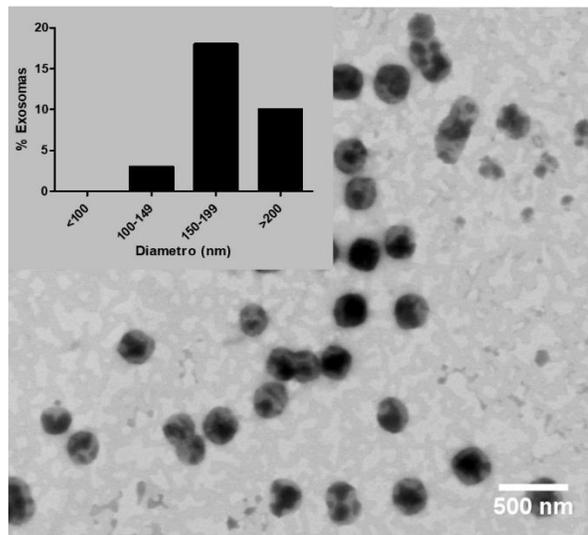


Figura 4.11. Micrografía con su respectivo histograma de exosomas con AuNP-PEG-FA aislados por Exospin® modificado mediante microscopía electrónica de transmisión.

Por otro lado, estas muestras de exosomas con AuNPs se analizaron por *western blotting* para detectar proteínas características de estas nanovesículas. Para esto se realizó el experimento según lo descrito en la sección 3.4.1.5.3. con los anticuerpos de las proteínas TSG101 y Calnexina (control negativo). Como se observa en la Figura 4.12 (E y G) las muestras de exosomas con AuNPs poseen la presencia de la proteína TSG101 la cual se encuentra involucrada en la formación de las nanovesículas⁹. Por otro lado, en ambas muestras se aprecia la ausencia de la proteína Calnexina la cual es una proteína del retículo endoplásmico que no debe estar presente en exosomas. Con respecto a esta proteína podemos observar que se encontró presente en el lisado de células B16F10 (A). Finalmente, los resultados dan cuenta que el método de Exospin® modificado entrega muestras que poseen exosomas lo cual en el caso del Exospin® tradicional no se observó para exosomas con AuNP-PEG-R7CLPFFD (Figura 4.12 (I)).

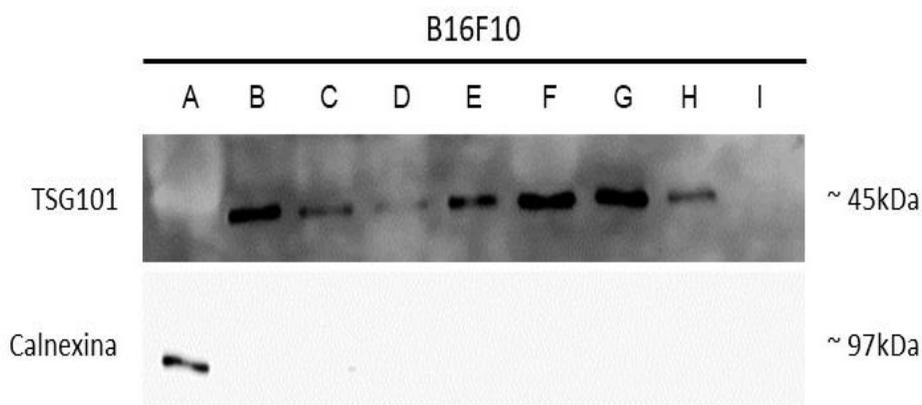


Figura 4.12. *Western blotting* de (A) Células B16F10, (B) Exosomas B16F10 por Exospin®, (C) Exosomas B16F10 por UC, (D) Exosomas con AuNP-PEG-R7LPFFD por UC, (E) Exosomas con AuNP-PEG-R7CLPFFD por Exospin Modificado, (F) Exosomas con AuNP-PEG-FA por UC, (G) Exosomas con AuNP-PEG-FA por Exospin Modificado, (H) Exosomas con AuNP-PEG-FA por Exospin y (I) Exosomas con AuNP-PEG-R7CLPFFD por Exospin. El experimento fue realizado con un $n = 3$.

Finalmente, se evaluó la incorporación de las AuNPs en los exosomas por espectrofotometría UV-visible y activación neutrónica siguiendo el apartado 3.5.1. y 3.5.2. respectivamente. Por una parte, se empleó espectrofotometría UV-visible para determinar el plasmón superficial característico de las AuNPs y así evidenciar su presencia. A partir de los resultados de la Figura 4.13 se puede observar que los exosomas con AuNPs obtenidos a través de Exospin® modificado presentan un máximo de absorción alrededor de los 500 nm de longitud. Los resultados anteriores mostraron que los exosomas aislados a partir de las células B16F10 sin incubación con AuNPs no presentan este pico de absorción (Figura 4.9). Por lo tanto, podríamos decir que el método de Exospin® modificado entrega exosomas con AuNPs detectables por UV-visible a diferencia de lo observado por Exospin® tradicional (Figura 4.9).

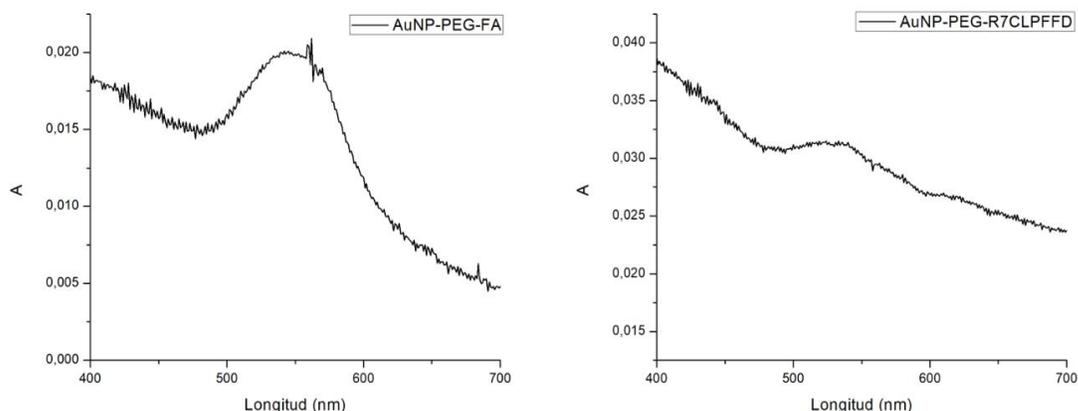


Figura 4.13. Espectros de absorción UV-visible de exosomas con incorporación de (A) AuNP-PEG-FA y (B) AuNP-PEG-R7CLPFFD por Exospin® modificado.

Finalmente, se determinó la cantidad de oro en las muestras de exosomas por Exospin® modificado mediante análisis por activación neutrónica en la CCHEN. Como podemos observar en la Figura 4.14 los exosomas con AuNP-PEG-FA y AuNP-PEG-R7CLPFFD poseen 3500 y 500 nanogramos (ng) de oro, respectivamente. En el caso del control el cual consiste en exosomas desde células B16F10 sin incubación con AuNPs presentaron 9 ng de oro. A partir de esto, se puede concluir que los exosomas que se obtienen por Exospin® modificado presentan una cantidad de oro significativamente superior a los obtenidos por Exospin® (Figura 4.15 (A)). Esto concuerda con lo observado por espectrofotometría UV-visible, en el cual no se pudo detectar la presencia de AuNPs en los exosomas aislados por Exospin® tradicional (Figura 4.9). Adicionalmente, la cantidad de oro de las muestras de exosomas con AuNP-PEG-FA por Exospin® modificado alcanzó los valores obtenidos anteriormente por ultracentrifugación (Figura 4.15 (B)). Finalmente, cabe destacar que la cantidad de medio para el aislamiento de exosomas con AuNPs empleado para realizar el protocolo Exospin® modificado fue tres veces menor al utilizado para el método de ultracentrifugación.

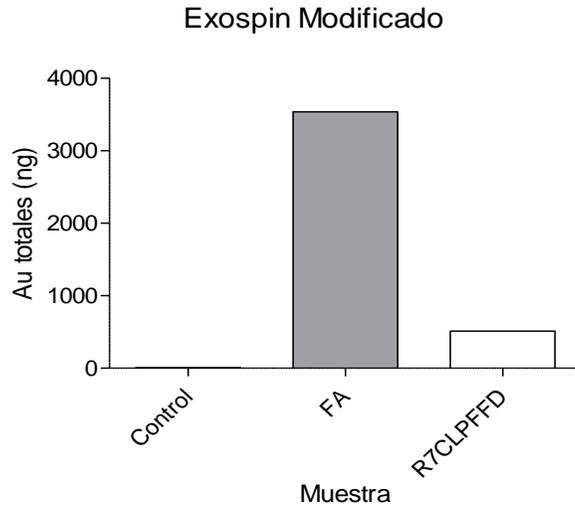


Figura 4.14. Cantidad de oro (ng) por cada 100 μ g de proteínas de exosomas con incorporación de AuNP-PEG-FA ó AuNP-PEG-R7CLPFFD obtenidos por Exospin® modificado. El experimento fue realizado con un n = 1.

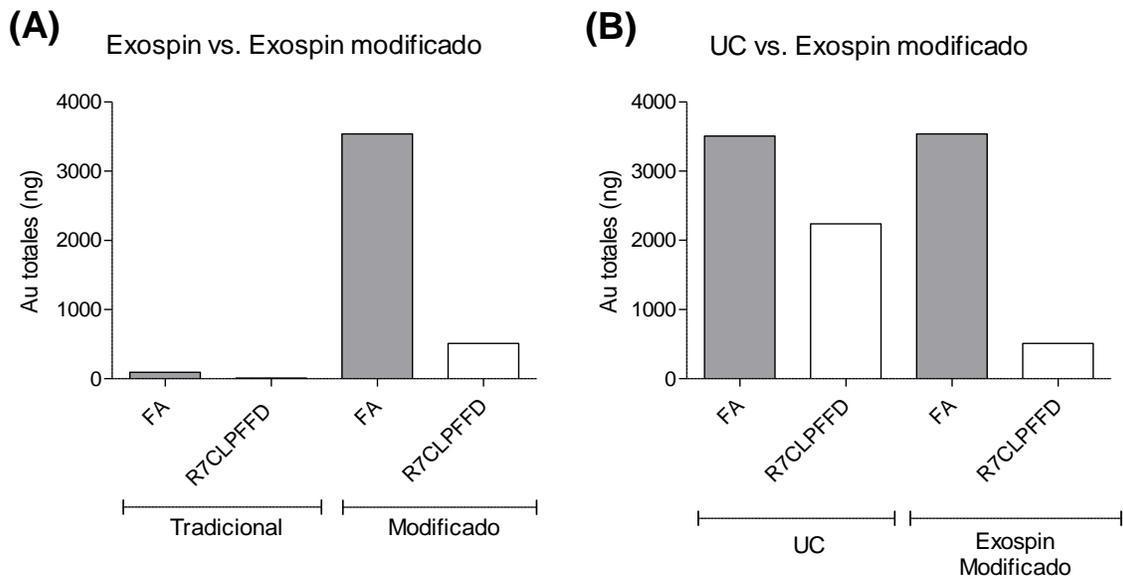


Figura 4.15. Cantidad de oro (ng) por cada 100 μ g de proteínas de exosomas con AuNPs obtenidos por (A) Exospin® vs. Exospin® modificado y (B) Ultracentrifugación vs. Exospin® modificado cuantificada por activación neutrónica. El experimento fue realizado con un n = 1.

5. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron y caracterizaron nanopartículas de oro (AuNP-cit) y sus conjugados funcionalizados con polietilenglicol (AuNP-PEG), ácido fólico (AuNP-PEG-FA) y R7CLPFFD (AuNP-PEG-R7CLPFFD).
- Se determinó que los nanosistemas AuNP-PEG-FA y AuNP-PEG-R7CLPFFD entre las concentraciones de 0,1 y 4 nM no producen efectos sobre la viabilidad celular en la línea celular B16F10.
- Se determinó empleando espectrofotometría UV-visible, microscopía confocal y cuantificación de oro por activación neutrónica, GDJ que las AuNP funcionalizadas con FA y con R7CLPFFD se adhieren/internalizan en las células B16F10.
- Se realizó el aislamiento y caracterización de exosomas provenientes de la línea celular B16F10.
- Se realizó el aislamiento y caracterización de muestras de exosomas con la presencia de nanopartículas de oro desde la línea celular B16F10.
- Se desarrolló una estrategia efectiva para la inclusión de AuNPs en exosomas por medio de la incubación de estas con las células B16F10.
- Se optimizó el protocolo de aislamiento por Exospin® para la obtención de exosomas con una mayor cantidad de nanopartículas de oro.

6. REFERENCIAS

1. *Nanotechnology and Drug Delivery, Volume Two: Nano-Engineering Strategies and Nanomedicines against Severe Diseases*. 2016; Vol. 2, p 487.
2. Cai, W.; Gao, T.; Hong, H.; Sun, J., Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *Nanotechnol Sci Appl* **2008**, 1, 17-32.
3. Wang, G.; Wang, J. J.; Li, F.; To, S. T., Development and Evaluation of a Novel Drug Delivery: Pluronics/SDS Mixed Micelle Loaded With Myricetin In Vitro and In Vivo. *Journal of pharmaceutical sciences* **2016**.
4. Sun, D.; Zhuang, X.; Xiang, X.; Liu, Y.; Zhang, S.; Liu, C.; Barnes, S.; Grizzle, W.; Miller, D.; Zhang, H. G., A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **2010**, 18 (9), 1606-14.
5. Fofaria, N. M.; Qhattal, H. S.; Liu, X.; Srivastava, S. K., Nanoemulsion formulations for anti-cancer agent piplartine-Characterization, toxicological, pharmacokinetics and efficacy studies. *International journal of pharmaceutics* **2016**, 498 (1-2), 12-22.
6. Prades, R.; Guerrero, S.; Araya, E.; Molina, C.; Salas, E.; Zurita, E.; Selva, J.; Egea, G.; Lopez-Iglesias, C.; Teixido, M.; Kogan, M. J.; Giralt, E., Delivery of gold nanoparticles to the brain by conjugation with a peptide that recognizes the transferrin receptor. *Biomaterials* **2012**, 33 (29), 7194-205.
7. Hood, J. L.; Scott, M. J.; Wickline, S. A., Maximizing exosome colloidal stability following electroporation. *Analytical biochemistry* **2014**, 448, 41-9.
8. Vlassov, A. V.; Magdaleno, S.; Setterquist, R.; Conrad, R., Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et biophysica acta* **2012**, 1820 (7), 940-8.
9. Frydrychowicz, M.; Kolecka-Bednarczyk, A.; Madejczyk, M.; Yasar, S.; Dworacki, G., Exosomes - structure, biogenesis and biological role in non-small-cell lung cancer. *Scand J Immunol* **2015**, 81 (1), 2-10.
10. Ha, D.; Yang, N.; Nadithe, V., Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharm Sin B* **2016**, 6 (4), 287-96.
11. Raposo, G.; Stoorvogel, W., Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* **2013**, 200 (4), 373-83.
12. Aryani, A.; Denecke, B., Exosomes as a Nanodelivery System: a Key to the Future of Neuromedicine? *Mol Neurobiol* **2016**, 53 (2), 818-34.
13. Johnsen, K. B.; Gudbergsson, J. M.; Skov, M. N.; Pilgaard, L.; Moos, T.; Duroux, M., A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles - endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy. *Biochimica et biophysica acta* **2014**, 1846 (1), 75-87.
14. Peinado, H.; Aleckovic, M.; Lavotshkin, S.; Matei, I.; Costa-Silva, B.; Moreno-Bueno, G.; Hergueta-Redondo, M.; Williams, C.; Garcia-Santos, G.; Ghajar, C.; Nitadori-Hoshino, A.; Hoffman, C.; Badal, K.; Garcia, B. A.; Callahan, M. K.; Yuan, J.; Martins, V. R.; Skog, J.; Kaplan, R. N.; Brady, M. S.; Wolchok, J. D.; Chapman, P. B.; Kang, Y.; Bromberg, J.; Lyden, D., Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature medicine* **2012**, 18 (6), 883-91.
15. El Andaloussi, S.; Lakhali, S.; Mager, I.; Wood, M. J., Exosomes for targeted siRNA delivery across biological barriers. *Advanced drug delivery reviews* **2013**, 65 (3), 391-7.
16. Yeo, R. W.; Lai, R. C.; Zhang, B.; Tan, S. S.; Yin, Y.; Teh, B. J.; Lim, S. K., Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* **2013**, 65 (3), 336-41.

17. Ristorcelli, E.; Beraud, E.; Verrando, P.; Villard, C.; Lafitte, D.; Sbarra, V.; Lombardo, D.; Verine, A., Human tumor nanoparticles induce apoptosis of pancreatic cancer cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2008**, *22* (9), 3358-69.
18. Zhang, Y.; Luo, C. L.; He, B. C.; Zhang, J. M.; Cheng, G.; Wu, X. H., Exosomes derived from IL-12-anchored renal cancer cells increase induction of specific antitumor response in vitro: a novel vaccine for renal cell carcinoma. *International journal of oncology* **2010**, *36* (1), 133-40.
19. Sharma, S.; Das, K.; Woo, J.; Gimzewski, J. K., Nanofilaments on glioblastoma exosomes revealed by peak force microscopy. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* **2014**, *11* (92), 20131150.
20. Escudier, B.; Dorval, T.; Chaput, N.; Andre, F.; Caby, M. P.; Novault, S.; Flament, C.; Leboulaire, C.; Borg, C.; Amigorena, S.; Boccaccio, C.; Bonnerot, C.; Dhellin, O.; Movassagh, M.; Piperno, S.; Robert, C.; Serra, V.; Valente, N.; Le Pecq, J. B.; Spatz, A.; Lantz, O.; Tursz, T.; Angevin, E.; Zitvogel, L., Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J Transl Med* **2005**, *3* (1), 10.
21. Besse, B.; Charrier, M.; Lapierre, V.; Dansin, E.; Lantz, O.; Planchard, D.; Le Chevalier, T.; Livartoski, A.; Barlesi, F.; Laplanche, A.; Ploix, S.; Vimond, N.; Peguillet, I.; Thery, C.; Lacroix, L.; Zoernig, I.; Dhodapkar, K.; Dhodapkar, M.; Viaud, S.; Soria, J. C.; Reiners, K. S.; Pogge von Strandmann, E.; Vely, F.; Rusakiewicz, S.; Eggermont, A.; Pitt, J. M.; Zitvogel, L.; Chaput, N., Dendritic cell-derived exosomes as maintenance immunotherapy after first line chemotherapy in NSCLC. *Oncoimmunology* **2016**, *5* (4), e1071008.
22. Dai, S.; Wei, D.; Wu, Z.; Zhou, X.; Wei, X.; Huang, H.; Li, G., Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **2008**, *16* (4), 782-90.
23. Wiklander, O. P.; Nordin, J. Z.; O'Loughlin, A.; Gustafsson, Y.; Corso, G.; Mager, I.; Vader, P.; Lee, Y.; Sork, H.; Seow, Y.; Heldring, N.; Alvarez-Erviti, L.; Smith, C. I.; Le Blanc, K.; Macchiarelli, P.; Jungebluth, P.; Wood, M. J.; Andaloussi, S. E., Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *J Extracell Vesicles* **2015**, *4*, 26316.
24. Hoshino, A.; Costa-Silva, B.; Shen, T. L.; Rodrigues, G.; Hashimoto, A.; Tesic Mark, M.; Molina, H.; Kohsaka, S.; Di Giannatale, A.; Ceder, S.; Singh, S.; Williams, C.; Soplop, N.; Uryu, K.; Pharmed, L.; King, T.; Bojmar, L.; Davies, A. E.; Ararso, Y.; Zhang, T.; Zhang, H.; Hernandez, J.; Weiss, J. M.; Dumont-Cole, V. D.; Kramer, K.; Wexler, L. H.; Narendran, A.; Schwartz, G. K.; Healey, J. H.; Sandstrom, P.; Labori, K. J.; Kure, E. H.; Grandgenett, P. M.; Hollingsworth, M. A.; de Sousa, M.; Kaur, S.; Jain, M.; Mallya, K.; Batra, S. K.; Jarnagin, W. R.; Brady, M. S.; Fodstad, O.; Muller, V.; Pantel, K.; Minn, A. J.; Bissell, M. J.; Garcia, B. A.; Kang, Y.; Rajasekhar, V. K.; Ghajar, C. M.; Matei, I.; Peinado, H.; Bromberg, J.; Lyden, D., Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **2015**, *527* (7578), 329-35.
25. Shtam, T. A.; Kovalev, R. A.; Varfolomeeva, E. Y.; Makarov, E. M.; Kil, Y. V.; Filatov, M. V., Exosomes are natural carriers of exogenous siRNA to human cells in vitro. *Cell communication and signaling : CCS* **2013**, *11*, 88.
26. Zhang, Y.; Liu, D.; Chen, X.; Li, J.; Li, L.; Bian, Z.; Sun, F.; Lu, J.; Yin, Y.; Cai, X.; Sun, Q.; Wang, K.; Ba, Y.; Wang, Q.; Wang, D.; Yang, J.; Liu, P.; Xu, T.; Yan, Q.; Zhang, J.; Zen, K.; Zhang, C. Y., Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Molecular cell* **2010**, *39* (1), 133-44.
27. Pascucci, L.; Cocce, V.; Bonomi, A.; Ami, D.; Ceccarelli, P.; Ciusani, E.; Vigano, L.; Locatelli, A.; Sisto, F.; Doglia, S. M.; Parati, E.; Bernardo, M. E.; Muraca, M.; Alessandri, G.

Bondiolotti, G.; Pessina, A., Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: a new approach for drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2014**, *192*, 262-70.

28. Batrakova, E. V.; Kim, M. S., Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *J Control Release* **2015**, *219*, 396-405.

29. Roma-Rodrigues, C.; Pereira, F.; Alves de Matos, A. P.; Fernandes, M.; Baptista, P. V.; Fernandes, A. R., Smuggling gold nanoparticles across cell types - A new role for exosomes in gene silencing. *Nanomedicine* **2017**, *13* (4), 1389-1398.

30. Khoshnevisan, K.; Daneshpour, M.; Barkhi, M.; Gholami, M.; Samadian, H.; Maleki, H., The Promising Potentials of Capped Gold Nanoparticles for Drug Delivery Systems. *J Drug Target* **2017**, 1-26.

31. Ghosh, P.; Han, G.; De, M.; Kim, C. K.; Rotello, V. M., Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced drug delivery reviews* **2008**, *60* (11), 1307-15.

32. Boisselier, E.; Astruc, D., Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chemical Society reviews* **2009**, *38* (6), 1759-82.

33. Gharpure, K. M.; Wu, S. Y.; Li, C.; Lopez-Berestein, G.; Sood, A. K., Nanotechnology: Future of Oncotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2015**, *21* (14), 3121-30.

34. Essig, M.; Debus, J.; Schlemmer, H. P.; Hawighorst, H.; Wannemacher, M.; van Kaick, G., [Improved tumor contrast and delineation in the stereotactic radiotherapy planning of cerebral gliomas and metastases with contrast media-supported FLAIR imaging]. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft ... [et al]* **2000**, *176* (2), 84-94.

35. Guerrero, A. R.; Hassan, N.; Escobar, C. A.; Albericio, F.; Kogan, M. J.; Araya, E., Gold nanoparticles for photothermally controlled drug release. *Nanomedicine (London, England)* **2014**, *9* (13), 2023-39.

36. Stefani, M.; Dobson, C. M., Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **2003**, *81* (11), 678-99.

37. Berry, C. C., and Curtis, A.S.G., Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics* **2003**.

38. Furlani, E. P.; Karampelas, I. H.; Xie, Q., Analysis of pulsed laser plasmon-assisted photothermal heating and bubble generation at the nanoscale. *Lab Chip* **2012**, *12* (19), 3707-19.

39. Fischer, H. C.; Chan, W. C., Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. *Current opinion in biotechnology* **2007**, *18* (6), 565-71.

40. Alkilany, A. M.; Nalaria, P. K.; Hexel, C. R.; Shaw, T. J.; Murphy, C. J.; Wyatt, M. D., Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: molecular origin of cytotoxicity and surface effects. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2009**, *5* (6), 701-8.

41. Malugin, A.; Ghandehari, H., Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles in prostate cancer cells: a comparative study of rods and spheres. *Journal of applied toxicology : JAT* **2010**, *30* (3), 212-7.

42. Qiu, Y.; Liu, Y.; Wang, L.; Xu, L.; Bai, R.; Ji, Y.; Wu, X.; Zhao, Y.; Li, Y.; Chen, C., Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials* **2010**, *31* (30), 7606-19.

43. Nativo, P.; Prior, I. A.; Brust, M., Uptake and intracellular fate of surface-modified gold nanoparticles. *ACS nano* **2008**, *2* (8), 1639-44.

44. Chithrani, B. D.; Ghazani, A. A.; Chan, W. C., Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano letters* **2006**, *6* (4), 662-8.

45. Arnida; Malugin, A.; Ghandehari, H., Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles in prostate cancer cells: a comparative study of rods and spheres. *Journal of applied toxicology : JAT* **2010**, *30* (3), 212-7.
46. Cartiera, M. S.; Johnson, K. M.; Rajendran, V.; Caplan, M. J.; Saltzman, W. M., The uptake and intracellular fate of PLGA nanoparticles in epithelial cells. *Biomaterials* **2009**, *30* (14), 2790-8.
47. Cho, E. C.; Xie, J.; Wurm, P. A.; Xia, Y., Understanding the role of surface charges in cellular adsorption versus internalization by selectively removing gold nanoparticles on the cell surface with a I2/KI etchant. *Nano letters* **2009**, *9* (3), 1080-4.
48. Leroueil, P. R.; Berry, S. A.; Duthie, K.; Han, G.; Rotello, V. M.; McNerny, D. Q.; Baker, J. R., Jr.; Orr, B. G.; Holl, M. M., Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers. *Nano letters* **2008**, *8* (2), 420-4.
49. Lin, J.; Zhang, H.; Chen, Z.; Zheng, Y., Penetration of lipid membranes by gold nanoparticles: insights into cellular uptake, cytotoxicity, and their relationship. *ACS nano* **2010**, *4* (9), 5421-9.
50. Zwicke, G. L.; Mansoori, G. A.; Jeffery, C. J., Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics. *Nano Rev* **2012**, *3*.
51. Bahrami, B.; Mohammadnia-Afrouzi, M.; Bakhshaei, P.; Yazdani, Y.; Ghalamfarsa, G.; Yousefi, M.; Sadreddini, S.; Jadidi-Niaragh, F.; Hojjat-Farsangi, M., Folate-conjugated nanoparticles as a potent therapeutic approach in targeted cancer therapy. *Tumour Biol* **2015**, *36* (8), 5727-42.
52. Zhong, Y.; Meng, F.; Deng, C.; Zhong, Z., Ligand-directed active tumor-targeting polymeric nanoparticles for cancer chemotherapy. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (6), 1955-69.
53. Li, H.; Tsui, T. Y.; Ma, W., Intracellular Delivery of Molecular Cargo Using Cell-Penetrating Peptides and the Combination Strategies. *International journal of molecular sciences* **2015**, *16* (8), 19518-36.
54. Schmidt, N.; Mishra, A.; Lai, G. H.; Wong, G. C., Arginine-rich cell-penetrating peptides. *FEBS letters* **2010**, *584* (9), 1806-13.
55. Trabulo, S.; Cardoso, A. L.; Mano, M.; De Lima, M. C., Cell-Penetrating Peptides-Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems. *Pharmaceuticals (Basel)* **2010**, *3* (4), 961-993.
56. Marchesano, V.; Hernandez, Y.; Salvenmoser, W.; Ambrosone, A.; Tino, A.; Hobmayer, B.; de la Fuente, J. M.; Tortiglione, C., Imaging inward and outward trafficking of gold nanoparticles in whole animals. *ACS nano* **2013**, *7* (3), 2431-42.
57. Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J., A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society* **1951**, *11* (0), 55-75.
58. Lévy, R.; Thanh, N. T. K.; Doty, R. C.; Hussain, I.; Nichols, R. J.; Schiffrin, D. J.; Brust, M.; Fernig, D. G., Rational and Combinatorial Design of Peptide Capping Ligands for Gold Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126* (32), 10076-10084.
59. Huang, X.; Peng, X.; Wang, Y.; Wang, Y.; Shin, D. M.; El-Sayed, M. A.; Nie, S., A reexamination of active and passive tumor targeting by using rod-shaped gold nanocrystals and covalently conjugated peptide ligands. *ACS nano* **2010**, *4* (10), 5887-96.
60. They, C.; Amigorena, S.; Raposo, G.; Clayton, A., Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* **2006**, *Chapter 3*, Unit 3 22.
61. Smith PK, K. R., Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC., Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* **1985**.

62. Daniel A. Cruz¹, M. C. R. g., Juan M. López¹, Virginia M. Herrera¹, Alejandro G. Orive¹, Alberto H. Creus^{1*}. Metallic nanoparticles and surface plasmons: a deep relationship. Universidad de La Laguna, Tenerife - España, 2011.
63. Cauda, V.; Argyo, C.; Bein, T., Impact of different PEGylation patterns on the long-term bio-stability of colloidal mesoporous silica nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* **2010**, *20* (39), 8693-8699.
64. Steinmetz, N. F.; Manchester, M., PEGylated viral nanoparticles for biomedicine: the impact of PEG chain length on VNP cell interactions in vitro and ex vivo. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (4), 784-92.
65. Yamashita, T.; Takahashi, Y.; Nishikawa, M.; Takakura, Y., Effect of exosome isolation methods on physicochemical properties of exosomes and clearance of exosomes from the blood circulation. *Eur J Pharm Biopharm* **2016**, *98*, 1-8.