

Ana Isabel Gallego Lleyda

Mecanismos efectores inmunológicos y su aplicación como terapia anti-tumoral

Director/es

Martínez Lostao, Luis
Pardo Jimeno, Julián

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



© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

MECANISMOS EFECTORES INMUNOLÓGICOS Y SU APLICACIÓN COMO TERAPIA ANTI-TUMORAL

Autor

Ana Isabel Gallego Lleyda

Director/es

Martínez Lostao, Luis
Pardo Jimeno, Julián

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

2020



Universidad
Zaragoza



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

Tesis Doctoral

MECANISMOS EFECTORES INMUNOLÓGICOS Y SU APLICACIÓN COMO TERAPIA ANTI- TUMORAL

Memoria presentada por

Ana Isabel Gallego Lleyda

Licenciada en Bioquímica

Para optar al grado de Doctor en Ciencias por la

Universidad de Zaragoza

Julio 2020

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a un contrato de Personal Investigador Predoctoral en Formación del Gobierno de Aragón (BOA num. 214 de 10/12/2014).

“Conserva celosamente tu derecho a pensar, porque incluso pensar de manera errónea es mejor que no pensar”

Hipatia de Alejandría

ABREVIATURAS

7-AAD	7-Aminoactinomicina D
ALT	Alanina aminotransferasa
Apaf-1	<i>Apoptosis Protease-Activating Factor-1</i> (Factor-1 de activación de proteasas apoptóticas)
AST	Aspartato aminotransferasa
BCA	<i>Bicinchoninic acid assay</i>
BH	<i>Bcl-2 Homology</i> (Homólogo Bcl-2)
BORT	Bortezomib
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albúmina sérica bovina)
CARD	<i>Caspase Recruitment Domain</i> (Dominio de reclutamiento de caspasa)
CDK	<i>Cyclin Dependent Kinase</i> (Quinasa dependiente de ciclina)
CEA	<i>Carcinoembryonic Antigen</i> (Antígeno carcinoembrionario)
cFLIP	<i>Cellular FLICE-like Inhibitory Protein</i> (Inhibidor celular protéico similar a “Flice”)
CHOL	Colesterol
CK	Creatin-Kinasa
CRD	<i>Cystein Rich Domains</i> (Dominios ricos en cisteína)
CrmA	<i>Cytokine Response Modifier A</i> (Modificador A de respuesta a citoquinas)
DAMP	<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i> (Patrones moleculares asociados a daño)
DD	<i>Death Domain</i> (Dominio de muerte)
DED	<i>Death Effector Domain</i> (Dominio efector de muerte)
DISC	<i>Death-Inducing Signaling Complex</i> (Complejo señalizador inductor de muerte)
DOX	Doxorrubicina
DR	<i>Death Receptor</i> (Receptor mortal)
DUB	Enzima deubiquitinasa
EDF	Edelfosina
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> (Receptor del factor de crecimiento epidermal)
EPR	<i>Enhanced Permeability and Retention Effect</i> (Efecto de mejora en la permeabilidad y retención)
ER	Estrés del retículo endoplasmático
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinases</i> (Quinasas reguladoras de la señal extracelular)
FasL	Fas ligando
FADD	<i>Fas Associated Death Domain</i> (Dominio de muerte asociado a Fas)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administración de alimentos y medicamentos)
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> (Isocianato de fluoresceína)
FVP	Flavopiridol
HDAC	<i>Histone Deacetylase</i> (Enzima histona deacetilasa)
HDACi	<i>Histone Deacetylase Inhibitor</i> (Inhibidor de histona deacetilasa)
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i> (Inhibidor de proteína de apoptosis)

IFNγ	Interferón γ
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
IU	<i>International Activity Units</i> (Unidad internacional de actividad)
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinases</i> (Quinasas N-terminal c-Jun)
kDa	KiloDalton
LUBAC	<i>Large Ubiquitin Binding Complex</i> (Complejo grande de unión de ubiquitina)
LUV	<i>Large Unilamellar Vesicles</i> (Vesículas unilaminares grandes)
MAC	<i>Mitochondrial Apoptosis-Induced Channel</i> (Canal mitocondrial de inducción de apoptosis)
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i> (MAP quinasa)
MIT C	Mitomicina C
MOMP	<i>Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization</i> (Permeabilización de la membrana externa mitocondrial)
MTT	<i>Dimethylthiazol-diphenyltetrazolium bromide</i> (Bromuro de dimetil-tiazoliltetrazolio)
MVB	<i>Multivesicular Bodies</i> (Cuerpos multivesiculares)
Nec-1	Necrostatina 1
NEMO	<i>NF-κB Essential Modulator</i> (Modulador esencial NF- κ B)
NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of Activated B Cells</i> (Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas)
NK	<i>Natural Killer</i> (Asesina natural)
OPG	Osteoprotegerina
PBMC	<i>Peripheral Blood Monocytic cells</i> (Células mononucleares de sangre periférica)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampón fosfato salino)
PC	Fosfatidilcolina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
PEG	Polietilenglicol
PHH	<i>Primary Human Hepatocytes</i> (Hepatocitos humanos primarios)
PLAD	<i>Preligand Assembly Domain</i> (Dominio de ensamblaje preligando)
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i> (Activador del receptor del ligando NF- κ B)
RING	<i>Really Interesting New Gene</i> (Nuevo gen realmente interesante)
RIP1	<i>Receptor-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase 1</i> (Serin/treonin proteína quinasa 1 que interactúa con receptor)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Especies reactivas de oxígeno)
SAMP	<i>Stress-Associated Molecular Patterns</i> (Patrones moleculares asociados al estrés)
scFv	<i>single-chain variable Fragment</i> (Fragmento variable de cadena sencilla)
SD	<i>Standard Deviation</i> (Derivación estándar)
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)
SFB	Suero fetal bovino
SM	Esfingomielina
Smac/DIABLO	<i>Second Mitochondria-Derived Activator of Caspases/ Direct IAP-Binding Protein with Low pI</i> (Segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria/Proteína

de unión directa a IAP con bajo pl)

sTRAIL	TRAIL soluble
STS	<i>Soft Tissue Sarcoma</i> (Sarcoma de partes blandas)
THD	<i>TNF Homology Domain</i> (Dominios de homología TNF)
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Factor de necrosis tumoral)
TNF-R	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i> (Receptor del factor de necrosis tumoral)
TNF-RSC	<i>TNF-Receptor Signalling Complex</i> (Complejo señalizador del receptor TNF)
TRAB	Trabectedina
TRADD	<i>TNF-R Associated Death Domain</i> (Dominio de muerte asociado a TNF-R)
TRAF2	<i>TNF Receptor-Associated Factor 2</i> (Factor 2 asociado al receptor TNF)
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i> (Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF)
TRAIL-R	Receptor de TRAIL
XIAP	<i>X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein</i> (Inhibidor apoptótico proteico ligado a X)

ÍNDICE

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	3
1.1	Muerte celular.....	3
1.1.1	Apoptosis.....	4
1.1.1.1	Moléculas implicadas en el proceso de apoptosis.....	5
1.1.1.2	Rutas apoptóticas.....	11
1.1.2	Otros tipos de muerte celular programada: Necrosis programada	18
1.2	Apo2L/TRAIL.....	20
1.2.1	Estructura y función	20
1.2.2	Receptores	23
1.2.3	Oligomerización de los receptores para la correcta señalización de apoptosis	25
1.2.4	Mecanismos de regulación de la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL.....	30
1.2.4.1	Regulación de la secreción de Apo2L/TRAIL.....	31
1.2.4.2	Modificaciones post-traduccionales de los receptores de Apo2L/TRAIL.....	32
1.2.4.3	Regulación en la presencia de los receptores de Apo2L/TRAIL en la membrana plasmática	32
1.2.4.4	Regulación a nivel de formación del DISC.....	34
1.2.4.5	Regulación a nivel de la vía intrínseca.....	37
1.2.5	Ruta no canónica de Apo2L/TRAIL.....	37
1.3	Terapias anti-tumorales basadas en Apo2L/TRAIL.....	39
1.3.1	Desarrollo de nuevas estrategias en la terapia basada en Apo2L/TRAIL	44
1.3.1.1	Nuevas formulaciones de Apo2L/TRAIL	45
1.3.1.2	Nanopartículas en el tratamiento con Apo2L/TRAIL	47

1.4	Sarcomas	53
1.4.1	Generalidades	53
1.4.2	Tratamiento	54
1.4.3	Apo2L/TRAIL en sarcomas	55
2	ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	59
2.1	Antecedentes	59
2.2	Objetivos	60
3	MATERIALES Y MÉTODOS	65
3.1	Materiales	65
3.1.1	Reactivos y compuestos químicos	65
3.1.2	Proteínas	66
3.1.3	Anticuerpos	66
3.1.4	Tampones	67
3.1.5	Lípidos	67
3.1.6	Medios de cultivo, suplementos de cultivo y material para cultivo	68
3.1.7	Cepas bacterianas	69
3.1.8	Líneas celulares	69
3.1.9	Instrumentos	70
3.2	Métodos	71
3.2.1	Técnicas de biología molecular	71
3.2.1.1	Preparación de medios de cultivo bacterianos	71
3.2.1.2	Obtención de bacterias competentes	71
3.2.1.3	Transformación de bacterias	72
3.2.1.4	Extracción de DNA plasmídico	72
3.2.1.5	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	73

3.2.1.6	Electroforesis de DNA en gel de agarosa	73
3.2.2	Expresión y purificación de TRAIL recombinante en condiciones nativas	74
3.2.3	Técnicas basadas en proteínas	76
3.2.3.1	Análisis de la expresión de proteínas en la superficie celular ..	76
3.2.3.2	Extracción de proteínas celulares totales.....	76
3.2.3.3	Cuantificación de proteínas	77
3.2.3.4	SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis).....	77
3.2.3.5	Tinción de Coomassie	78
3.2.3.6	Técnica de Western blot	78
3.2.4	Generación de nanopartículas lipídicas	79
3.2.4.1	Preparación de liposomas tipo LUV	79
3.2.4.2	Variación en la composición lipídica de los LUV	80
3.2.4.3	Generación de LUV-TRAIL	84
3.2.4.4	Generación de LUVDOX y LUVDOX-TRAIL	84
3.2.4.5	Estudio de la encapsulación de flavopiridol dentro de liposomas	86
3.2.5	Cultivos celulares.....	88
3.2.5.1	Congelación y descongelación de líneas celulares	88
3.2.5.2	Mantenimiento del cultivo celular	89
3.2.5.3	Obtención de células primarias tumorales a partir de muestras de pacientes con sarcoma.....	89
3.2.6	Estudios de proliferación y muerte celular.....	90
3.2.6.1	Determinación de la viabilidad celular	90
3.2.6.2	Ensayo clonogénico.....	91

3.2.6.3	Determinación de la apoptosis y muerte celular mediante anexina-V y 7-AAD	92
3.2.7	Microscopía	93
3.2.7.1	Tinción nuclear mediante fluorescencia	93
3.2.7.2	Muestras histológicas	93
3.2.8	Experimentación <i>in vivo</i>	94
3.2.8.1	Modelo animal de experimentación	94
3.2.8.2	Estudio de la toxicidad in vivo de LUVDOX-TRAIL	94
3.2.8.3	Estudio de la actividad anti-tumoral in vivo de LUVDOX-TRAIL sobre células HT1080	95
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	99
4.1	Estudio comparativo del efecto de TRAIL soluble y LUV-TRAIL sobre líneas celulares tumorales de sarcoma	99
4.1.1	Estudio de la citotoxicidad de sTRAIL y LUV-TRAIL sobre líneas celulares tumorales de sarcoma	99
4.1.2	Estudio de la muerte celular inmunogénica inducida por TRAIL sobre líneas celulares tumorales de sarcoma	108
4.2	Tratamiento combinado de TRAIL con agentes sensibilizantes	111
4.2.1	Estudio del efecto combinatorio de TRAIL con agentes sensibilizantes en líneas celulares de sarcoma resistentes a TRAIL.....	112
4.2.2	Estudio del efecto combinatorio de TRAIL con agentes sensibilizantes en líneas celulares de sarcoma sensibles a TRAIL	117
4.2.3	Estudio de los mecanismos de acción de los agentes sensibilizantes a la apoptosis inducida por TRAIL	124
4.2.3.1	Estudio del mecanismo de acción de flavopiridol.....	125
4.2.3.2	Estudio del mecanismo de acción de doxorubicina.....	129
4.2.3.3	Estudio del mecanismo de acción de trabectedina	133

4.2.4 Caracterización de la muerte celular inducida por TRAIL en combinación con flavopiridol	136
4.2.4.1 Análisis del efecto a largo plazo en la supervivencia celular del tratamiento combinado de TRAIL con flavopiridol.....	143
4.3 Tratamiento combinado de TRAIL con inhibidores de histona deacetilasas	146
4.3.1 Estudio del efecto combinatorio de TRAIL con inhibidores de HDAC en líneas celulares de sarcoma sensibles a TRAIL.....	147
4.3.2 Estudio del efecto combinatorio de TRAIL con inhibidores de HDAC en líneas celulares de sarcoma resistentes a TRAIL	150
4.4 Efecto de la variación de la composición lipídica en la citotoxicidad de LUV-TRAIL.....	155
4.4.1 Efecto de la variación de la concentración de esfingomielinea en la citotoxicidad de LUV-TRAIL	155
4.4.2 Efecto de la variación de la concentración de fosfatidilcolina en la citotoxicidad de LUV-TRAIL	158
4.4.3 Efecto de la variación de la concentración de colesterol en la citotoxicidad de LUV-TRAIL	161
4.4.4 Efecto de la adición de edelfosina en la citotoxicidad de LUV-TRAIL	163
4.5 Encapsulación de agentes sensibilizantes en el interior de LUV-TRAIL .	171
4.5.1 Encapsulación de flavopiridol en LUV-TRAIL y estudio de su potencial citotóxico.....	171
4.5.2 Encapsulación de doxorubicina en LUV-TRAIL y estudio de su potencial citotóxico.....	177
4.6 Estudio de la actividad anti-tumoral <i>ex vivo</i> de LUVDOX-TRAIL en células tumorales primarias	195
4.7 Estudio de la actividad anti-tumoral <i>in vivo</i> de LUVDOX-TRAIL en un modelo tumoral animal	198
4.7.1 Estudio de la toxicidad <i>in vivo</i> de LUVDOX-TRAIL	198

4.7.2	Estudio de la actividad anti-tumoral <i>in vivo</i> de LUVDOX-TRAIL.....	201
5	DISCUSIÓN GENERAL	207
5.1	Validación del efecto de LUV-TRAIL sobre líneas celulares de sarcoma	208
5.2	Optimización del efecto citotóxico de LUV-TRAIL a través de diferentes aproximaciones experimentales	212
5.2.1	Terapia combinada de TRAIL con agentes sensibilizantes	212
5.2.2	Modificación de la composición lipídica de LUV-TRAIL.....	216
5.2.3	Encapsulación de agentes sensibilizantes en el interior de LUV-TRAIL	220
6	CONCLUSIONES	227
7	BIBLIOGRAFÍA	231

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Muerte celular

La muerte celular se consideraba inicialmente un evento fisiológico pasivo que tenía lugar en los organismos vivos. Los estudios de la metamorfosis en anfibios evidenciaron por primera vez la existencia de este proceso en 1842, cuando *Karl Vogt* describió la destrucción de células de la notocorda para la posterior neoformación de la estructura vertebral [1].

A pesar de que *Vogt* no acuñó ningún término específico, otros científicos a lo largo de todo el siglo XIX y mitad del siglo XX utilizaron conceptos como “histólisis” [2], “cromatosis” [3] y “oncosis” [4] para definir el proceso de muerte celular en distintas situaciones fisiológicas y tisulares. Es en el año 1964 cuando los científicos *Lockshin* y *Williams* introdujeron el término “muerte celular programada” tras observar la presencia de una regulación en el mecanismo de muerte celular en estudios de metamorfosis de insectos [5]. Posteriormente, *Kerr*, *Wyllie* y *Currie* diferencian dos tipos de muerte celular, aquella producida de forma patológica por un daño agudo (necrosis) y aquella producida de forma natural o fisiológica (apoptosis) [6]. Al año siguiente, en 1973, *Schweichel* y *Merker* realizaron una nueva clasificación atendiendo al análisis morfológico, observando 3 tipologías de muerte celular, lo que actualmente conocemos como apoptosis, autofagia y necrosis [7].

La ruta genética implicada en la muerte celular programada fue descrita inicialmente en *C. Elegans* [8] y posteriormente, empleando diversos modelos animales, se comprobó que en mamíferos la ruta era similar, siendo más compleja al poseer mayor número de elementos y mecanismos reguladores adicionales [9]. Por estos hallazgos, los científicos *Brenner*, *Horvitz* y *Sulston* fueron galardonados con Premio Nobel de Medicina y Fisiología en el año 2002.

1.1.1 Apoptosis

La apoptosis es el principal mecanismo de muerte celular programada y se caracteriza por un proceso de activación y ejecución de forma ordenada, siguiendo una secuencia de eventos definidos cuyos elementos se codifican genéticamente [10].

Los estímulos que activan el programa apoptótico son muy variados, englobando señales extra e intracelulares, que alertan de un daño celular irreparable que desencadena un suicidio celular silencioso, también llamada “muerte limpia”. Los cambios bioquímicos y morfológicos resultantes del proceso de apoptosis van a dar lugar al llamado fenotipo apoptótico [11], caracterizado principalmente por una estructura nuclear determinada (la condensación anormal de la cromatina y fragmentación nuclear), la caída del potencial mitocondrial y la exposición en la cara externa de la membrana plasmática de la fosfatidil-serina. Este último evento supone una señal de reconocimiento por parte de los macrófagos, que de forma fisiológica eliminan los cuerpos apoptóticos eficazmente sin que elementos citosólicos celulares queden expuestos al espacio extracelular, evitando así el desencadenamiento de un proceso inflamatorio [12-14].

La apoptosis, junto con las señales de proliferación, forman parte del balance que mantiene la homeostasis de los tejidos durante todo el desarrollo y la vida de los organismos pluricelulares. El desequilibrio, en cualquiera de los dos sentidos, desencadena situaciones patológicas asociadas con diversas enfermedades [15] (Figura 1.1).

INCREMENTO DE LA APOPTOSIS (aumento de la muerte celular y disminución de la proliferación)	INHIBICIÓN DE LA APOPTOSIS (aumento de la proliferación)
Enfermedades neurodegenerativas <ul style="list-style-type: none"> • Alzheimer • Parkinson • Esclerosis lateral amiotrófica • Retinosis pigmentaria • Epilepsia • Degeneración cerebelosa Enfermedades hematológicas <ul style="list-style-type: none"> • Anemia aplásica • Síndrome mielodisplásico • Linfocitopenia T CD4+ • Deficiencia en G6PD Daño tisular <ul style="list-style-type: none"> • Infarto de miocardio • Accidente cerebrovascular • Daño isquémico renal • Riñón poliquístico • Daño hepático por alcohol SIDA	Cáncer <ul style="list-style-type: none"> • Leucemias y linfomas • Gliomas y neuroblastomas • Carcinomas (colon, hígado, mama, ovario, próstata) • Tumores hormono-dependientes Enfermedades hematológicas <ul style="list-style-type: none"> • Lupus eritematoso • Glomerulonefritis autoinmune • <i>Myasthenia gravis</i> Enfermedades inflamatorias <ul style="list-style-type: none"> • Asma brinqual • Enfermedad inflamatoria intestinal Infecciones víricas <ul style="list-style-type: none"> • Adenovirus (E1B) • Herpesvirus • Poxvirus • Baculovirus

Figura 1.1 Patologías asociadas con alteraciones en el balance de los procesos apoptóticos y de proliferación celular. Modificada de “El suicidio y la muerte celular”, Lizarbe Iracheta, M.A. (2007).

1.1.1.1 Moléculas implicadas en el proceso de apoptosis

1.1.1.1.1 Caspasas

El término caspasa se acuñó en 1996 debido a la necesidad de homogeneizar la nomenclatura variada que se utilizaba hasta la fecha para designar a las proteasas de la familia ICE/CED3 [16]. Estas cisteín-proteasas son proteínas evolutivamente muy conservadas, con capacidad hidrolítica específica tras residuos de ácido aspártico [17]. Los miembros de esta familia se clasifican en dos grupos principales o subfamilias, en relación a su estructura y función: caspasas apoptóticas e inflamatorias.

A nivel estructural las caspasas se caracterizan por poseer un dominio variable en la región N-terminal, seguido de una subunidad catalítica grande (p20) y otra pequeña (p10) que juntas conformarán el dominio proteasa. Existen unas estructuras en el extremo N-terminal llamados dominios CARD (*Caspase Recruitment Domain*) o DED (*Death Effector Domain*) encargados del

reclutamiento y conformación de un multi-complejo proteico necesario para la activación de distintas vías de señalización. Los elementos CARD y/o DED constituyen lo que se denomina pro-dominio. Estos dominios están presentes en las caspasas pro-inflamatorias, encargadas del procesamiento y maduración de diversas citoquinas, y en las caspasas iniciadoras de la apoptosis, encargadas de activar la señalización de la apoptosis a través del procesamiento de las caspasas ejecutoras que serán las encargadas de proteolizar distintos sustratos desencadenando la muerte celular (Figura 1.2).

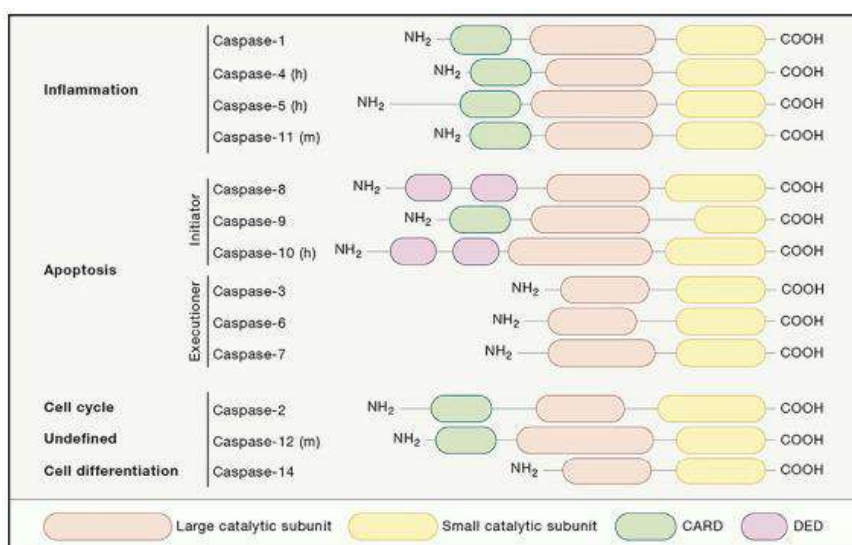


Figura 1.2 Representación esquemática de la clasificación funcional y estructural de la familia de las caspasas humanas (h) y murinas (m). "Caspases in cell death, inflammation, and disease", Van Opdenbosch, N. and Lamkanfi, M. (2019).

El mecanismo de auto-activación que presentan las caspasas con pro-dominio (caspasas inflamatorias e iniciadoras de la apoptosis) se denomina activación inducida por proximidad, en el que la dimerización de las moléculas genera unos cambios conformacionales que permiten la escisión y separación del pro-dominio de las subunidades grande y pequeña. Las caspasas efectoras no disponen de pro-dominio, por tanto requieren de las formas activadas de las caspasas iniciadoras para la escisión y activación de sus subunidades catalíticas, también en forma dimérica [17] (Figura 1.3).

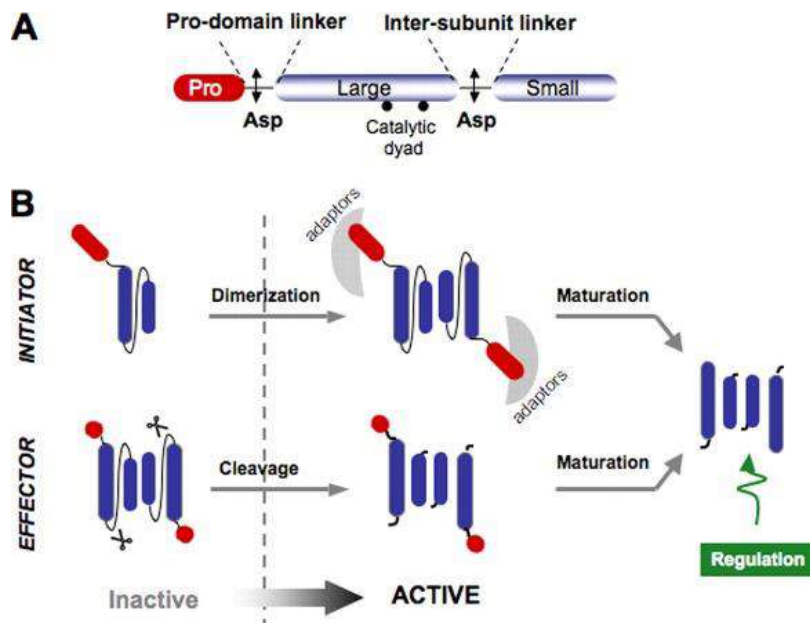


Figura 1.3 Estructura y mecanismo de activación de las caspasas. **A.** La estructura pro-dominio está unida al dominio catalítico a través de un *linker*. A su vez, las subunidades pequeña y grande están asociadas entre sí por otro *linker*. En estas regiones de unión se encuentran los residuos de ácido aspártico. **B.** La activación de las caspasas iniciadoras consiste en la dimerización y unión a proteínas adaptadoras para formar multi-complejos proteicos donde se producirá la maduración a las formas activas de la proteína. Éstas proteolizarán las formas inactivas de las caspasas efectoras. “Human caspases: activation, specificity, and regulation” Pop, C. and Salvesen, G.S. (2009).

1.1.1.1.2 Inhibidores de caspasas

Las caspasas apoptóticas son proteasas cuya activación es irreversible, ejerciendo una actividad letal en las células. Es por ello que presentan un complejo sistema de regulación que abarca distintos niveles.

A nivel genético, algunas caspasas presentan regulación mediante agentes de transcripción, como es el caso del interferón γ (IFN- γ) [18], o a través de modificaciones post-traduccionales, como fosforilaciones o nitrosilaciones, que modulan la actividad catalítica de la proteína [19]. La localización subcelular también juega un papel clave en el control de la transducción de la señal apoptótica. Aunque las caspasas efectoras se encuentran presentes en el citosol, las caspasas iniciadoras están ancladas a plataformas iniciadoras y sólo se liberan cuando se han activado en dicho complejo tras el reclutamiento de todos los elementos necesarios para ello [20-23].

Las caspasas son enzimas y, por tanto, están sometidas también a mecanismos de inhibición mediados por proteínas. Los péptidos CrmA (*Cytokine Response Modifier A*) y p35, ambos de origen viral y pertenecientes a una familia de proteínas denominada IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*), fueron las primeras moléculas descritas con capacidad de inhibir las caspasas. Estas proteínas confieren a los virus una doble protección ya que bloquean la inducción de muerte celular, permitiendo una óptima replicación viral, e inhiben la activación de procesos inflamatorios. CrmA procede del virus *Cowpox* y es capaz de bloquear la señalización de apoptosis a través de TNF (*Tumor Necrosis Factor*) al inhibir las caspasas -1, -8 y -10 [24]. Por otro lado, p35 procede de otro baculovirus (*Autographa californica*) y actúa sobre un amplio abanico de caspasas pro-inflamatorias y pro-apoptóticas [25]. El mecanismo de acción descrito consiste en una inhibición competitiva, donde las proteínas actúan como pseudo-sustratos uniéndose al sitio catalítico de su molécula diana e impidiendo su procesamiento y maduración a la forma activa.

En mamíferos, los miembros de la familia IAP se han descrito como los principales inhibidores fisiológicos de la apoptosis, sin embargo, también se encargan de regular otras vías de señalización como el movimiento y migración celular o la autofagia [26-28]. El miembro de la familia IAP mejor estudiado es XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*), cuya estructura se caracteriza por tener dominios BIR (*Baculoviral IAP Repeat*) y RING (*Really Interesting New Gene*). XIAP es capaz de unirse a caspasas iniciadoras (caspasa-9) y caspasas efectoras (caspasa-3 y -7) a través de los dominios BIR, impidiendo así su dimerización y activación [29-31]. Por otro lado, los dominios estructurales RING permiten el reclutamiento de otras proteínas que transferirán radicales de ubiquitina, marcando el complejo para su degradación en el proteasoma [32].

Existe una proteína con homología a las caspasas-8 y -10, conocida como cFLIP (*cellular FLICE-like Inhibitory Protein*), con un papel muy relevante en el control de la activación de las caspasas [33]. Aunque esta proteína presenta 3 isoformas distintas, todas estructuralmente presentan 2 dominios DED en el extremo N-terminal, de forma equivalente a las caspasas-8 y -10. La isoforma

larga (cFLIP_L), a diferencia de las isoformas cortas (cFLIP_S y cFLIP_R), dispone además de una región pro-dominio semejante a la de las caspasas, con la diferencia de no poseer centro catalítico activo (Figura 1.4). Es por ello que la proteína cFLIP recibe el nombre de pseudo-caspasa, ya que es una proteína homóloga a ellas pero careciendo de actividad proteasa [34, 35]. Esta característica hace que sea un elemento competitivo en el reclutamiento de las caspasas como parte del multi-complejo encargado de activar la señal apoptótica, modulando su activación.

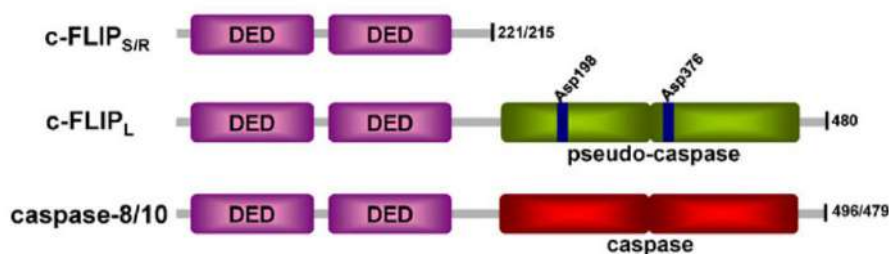


Figura 1.4 Representación esquemática de la estructura de las distintas isoformas de cFLIP y caspasa-8/10. El dominio DED está presente en la proteína cFLIP y las caspasas-8 y -10. La isoforma cFLIP_L tiene un pro-dominio homólogo al presente en las caspasas. Esta región, a pesar de disponer de sitios de corte (residuos de ácido aspártico, Asp), carece de actividad catalítica, considerándose una pseudo-caspasa. El número de aminoácidos de la proteína se muestra en el margen derecho. Modificado de “Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: A key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer”, Bagnoli, M. et al. (2009).

Los niveles de cFLIP, por tanto, van a determinar la sensibilidad de las células a la inducción de muerte celular estimulada por señales pro-apoptóticas. Se ha observado correlación entre los elevados niveles de expresión de las distintas isoformas de cFLIP y la baja respuesta clínica al tratamiento en ciertos tipos de cáncer [36-44].

Aunque la principal función de cFLIP es la prevención de la apoptosis, en determinados contextos celulares también es capaz de regular la señalización de supervivencia, proliferación y carcinogénesis. Se ha descrito que elevados niveles de cFLIP_L son capaces de activar las vías de señalización a través de NF-κB (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of Activated B Cells*) y ERK (*Extracellular Signal-Regulated Kinases*) [45, 46].

Por último, además de todas estas proteínas fisiológicas, hay que destacar que se han desarrollado compuestos sintéticos, diseñados a partir de la estructura de los sustratos de las caspasas, con objetivo de producir la inhibición alostérica (compuesto 34) o competitiva (z-VAD-fmk) de las caspasas [47, 48].

1.1.1.1.3 Proteínas de la familia Bcl-2

Las proteínas de la familia Bcl-2 son las principales responsables de la regulación apoptótica de la vía intrínseca (1.1.1.2.1). El factor común para todos los miembros del grupo es la presencia de regiones homólogas a Bcl-2, denominados dominios BH (*Bcl-2 Homology*). Sin embargo, a pesar de compartir estos elementos estructurales, las proteínas de esta familia presentan funciones opuestas en la mediación de la muerte celular, promoviendo o inhibiendo la apoptosis a través de interacciones entre ellas [49]. Es por ello que su clasificación responde a diferencias estructurales y funcionales (Figura 1.5).

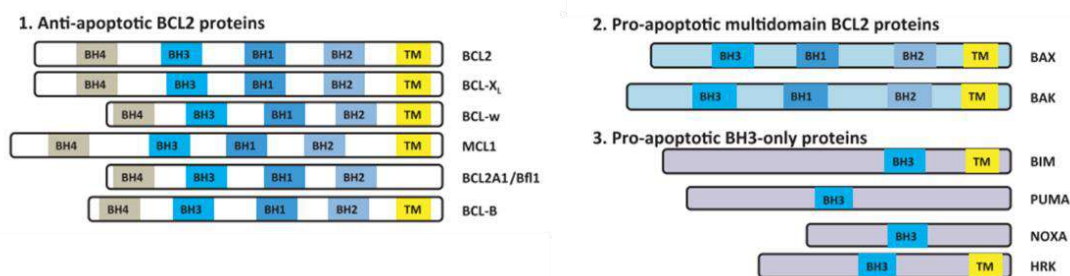


Figura 1.5 Representación esquemática de la clasificación funcional y estructural de las proteínas de la familia Bcl-2. Presencia y localización de los dominios BH1, BH2, BH3, BH4 y TM (región transmembrana). Modificado de “*Targeting anti-apoptotic BCL2 family proteins in haematological malignancies – from pathogenesis to treatment*”, Vogler, M. et al. (2017).

Existen 4 tipos de dominios BH distintos. Los dominios BH1, BH2 y BH3 están presentes en las proteínas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas, siendo el dominio BH3 diferente en ambos grupos. Además, el dominio BH4 se localiza exclusivamente en las proteínas anti-apoptóticas, dado que son las estructuras encargadas de interaccionar con los canales mitocondriales impidiendo la alteración de este orgánulo requerida para la apoptosis [14].

Las proteínas pro-apoptóticas se pueden subdividir en dos grupos. Las proteínas que presentan sólo el dominio BH3, denominadas *BH3-only*, constituyen el grupo de proteínas iniciadoras pro-apoptóticas, cuyo rol consiste en unirse directamente y secuestrar a las proteínas anti-apoptóticas, liberándose así las proteínas pro-apoptóticas efectoras. Este otro grupo se encarga de dimerizar y oligomerizar en la membrana externa mitocondrial, permitiendo la permeabilización de membrana (MOMP, *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*) con la consiguiente liberación de proteínas inductoras de la apoptosis como citocromo C o Smac/DIABLO (*Second Mitochondria-Derived Activator of Caspases/ Direct IAP-Binding Protein with Low pI*) [50] (Figura 1.6).

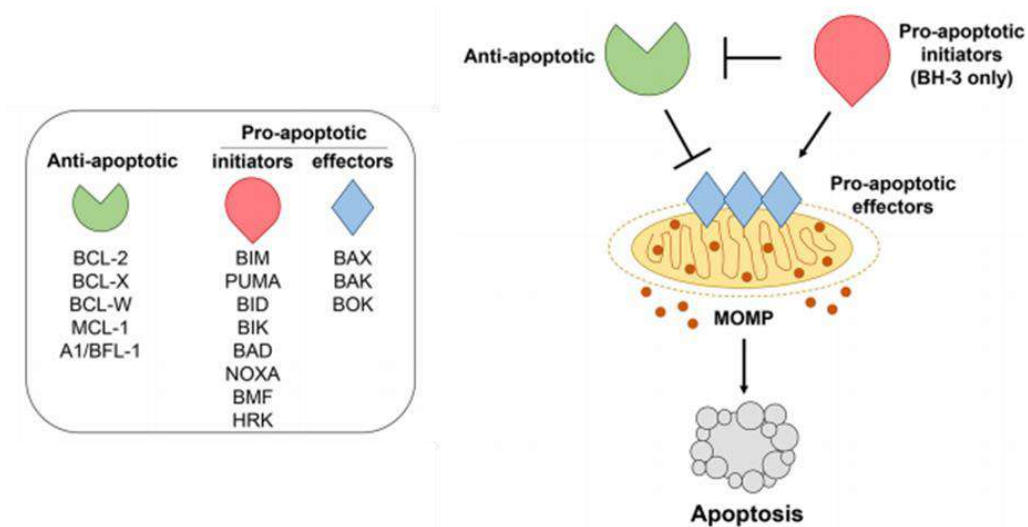


Figura 1.6 Proteínas de la familia Bcl-2 y su mecanismo de regulación de la apoptosis. Las proteínas pro-apoptóticas iniciadoras se activan ante señales de estrés celular, produciendo la inhibición de las proteínas anti-apoptóticas y activando las pro-apoptóticas efectoras. Las proteínas efectoras van a producir la permeabilización de la membrana por el mecanismo MOMP, que permite la ejecución del programa apoptótico. Modificado de “*Targeting the Bcl-2 family in B cell lymphoma*”, Adams, C.M. et al. (2019).

1.1.1.2 Rutas apoptóticas

Existen dos vías apoptóticas bien diferenciadas: la ruta intrínseca y la ruta extrínseca.

1.1.1.2.1 Vía intrínseca

Algunas señales de estrés celular son las responsables de activar la ruta más conservada a nivel evolutivo, la ruta intrínseca de la apoptosis. Esta vía también es conocida como ruta mitocondrial, ya que este orgánulo tiene un especial protagonismo en la regulación de la apoptosis [51].

Las lesiones celulares que desencadenan esta vía apoptótica se pueden producir a causa del mal funcionamiento de elementos internos, como el estrés del retículo endoplásmico producido por el plegamiento incorrecto de proteínas, o por agentes externos como la quimioterapia o radioterapia, que afectan directamente al DNA. Los daños producidos en el DNA van a activar los mecanismos de reparación de DNA, regulación del ciclo celular, anti-angiogénesis y transcripción de proteínas pro-apoptóticas, a través de la fosforilación de la proteína p53 [52]. La proteína p53 actúa por tanto como factor de transcripción clave para un amplio número de genes implicados en el control de la apoptosis y del desarrollo tumoral. Es por ello que la presencia de mutaciones en la proteína p53 está estrechamente relacionada con la resistencia de las células tumorales a fármacos quimioterápicos, observándose una tasa de mutación de p53 del 50% en el total de cánceres humanos [52].

La alteración en el balance de proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 es la causa desencadenante de la activación de la apoptosis vía intrínseca. La formación de los poros en la membrana externa mitocondrial por parte de las proteínas Bax y Bak, denominados MAC (*Mitochondrial Apoptosis-Induced Channel*), van a permitir la permeabilización (MOMP) y la consiguiente liberación desde el espacio inter-membrana al citosol de diversos componentes clave para la ejecución de la muerte celular. Entre ellos destaca el citocromo C, proteína que junto con Apaf-1 (*Apoptosis Protease-Activating Factor-1*) formará una estructura encargada de reclutar a la pro-caspasa-9, constituyendo así el apoptosoma [53]. Este complejo multi-proteico permite la activación de la caspasa-9 que actuará a su vez activando las caspasas efectoras -3, -6 y -7 induciendo la muerte celular (Figura 1.7).

Otra proteína liberada del espacio inter-membrana de la mitocondria durante la permeabilización es Smac/DIABLO. Ésta se une a XIAP favoreciendo la activación de la apoptosis [54-58].

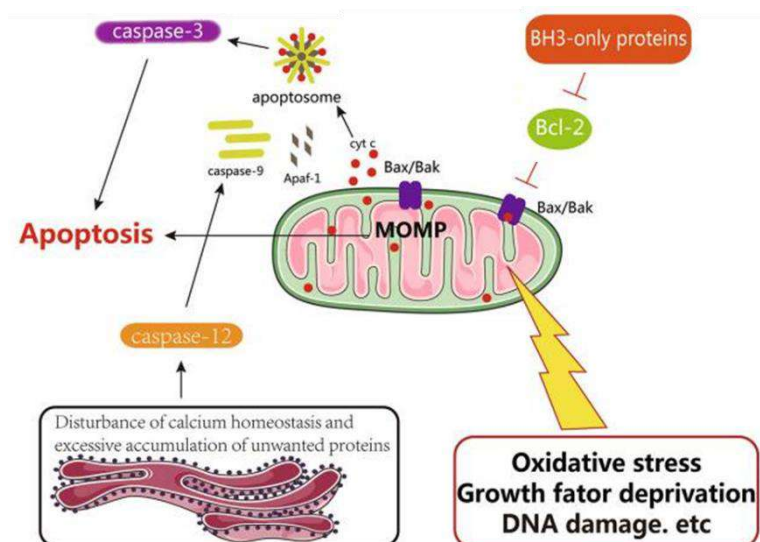


Figura 1.7 Vía intrínseca de la apoptosis. Modificado de “*The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis*”, Chen, Q. et al (2018).

1.1.1.2.2 Vía extrínseca

Las proteínas de la familia TNF son las responsables de inducir apoptosis a través de la vía extrínseca. Los miembros de esta familia actúan como ligandos, siendo los más destacados TNF- α , CD95L/FasL/Apo1L y Apo2L/TRAIL, que ejercen su función de señalización al interactuar con sus correspondientes receptores específicos, pertenecientes a la familia TNF-R (*Tumor Necrosis Factor Receptor*) [59, 60].

Las proteínas de la familia TNF, que también se conocen con el nombre de ligandos mortales, se expresan como monómeros que deben asociarse conformando homotrímeros para establecer una forma activa de la proteína. CD95L/FasL/Apo1L y Apo2L/TRAIL inducen principalmente una señal apoptótica, mientras que TNF- α impulsa una señalización pro-inflamatoria, aunque bajo determinadas circunstancias también es capaz de iniciar el programa apoptótico.

Los ligandos mortales son proteínas transmembrana tipo II en cuya región extracelular se encuentran los llamados dominios THD (*TNF Homology Domain*), formados por una secuencia de unos 150 aminoácidos que conformarán 2 hojas β anti-paralelas.

Los receptores de los ligandos mortales, también descritos con el nombre de receptores mortales, son respectivamente TNF-R1, TNF-R2, CD95/Fas, TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R2/DR5 [61]. Los receptores se encuentran anclados a la membrana plasmática, pertenecientes al grupo de proteínas transmembrana tipo I. Se caracterizan por poseer una región extracelular formada por unas estructuras ricas en cisteína llamadas CRD (*Cystein Rich Domains*), que a través de la región transmembrana se asocia a la región intracelular, en la que están presentes los llamados dominios de muerte o DD (*Death Domain*). Estas estructuras tienen un papel clave en la transducción de la señal apoptótica, siendo el sitio de unión donde se llevará a cabo el reclutamiento por parte de las proteínas adaptadoras, formando el multi-complejo proteico que constituirá la plataforma iniciadora de la señal apoptótica.

Los receptores mortales, además, se caracterizan por encontrarse pre-asociados formando homotrímeros en la superficie celular, gracias a la presencia de interacciones específicas entre las regiones CRD, denominados PLAD (*Preligand Assembly Domain*) [62-64]. Una vez tiene lugar la unión del ligando con el receptor (ambos en forma homotrimérica), se produce una serie de cambios estructurales a nivel extracelular e intracelular, que conducen a la asociación de las proteínas adaptadoras través del DD [65, 66]. Estas proteínas adaptadoras presentan en su estructura dominios DD y DED, lo que les permite hacer de plataforma para la transducción de señales gracias al reclutamiento de otras proteínas con regiones DED que iniciarán la cascada de señalización a nivel intracelular.

Existen 2 plataformas de transducción de señal principales. La correspondiente a la asociación de TNF- α con TNF-R1 se denomina TNF-RSC (*TNF-Receptor Signalling Complex*), mientras que la generada por la unión de

CD95L/FasL/Apo1L y Apo2L/TRAIL a sus correspondientes receptores recibe el nombre de DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*).

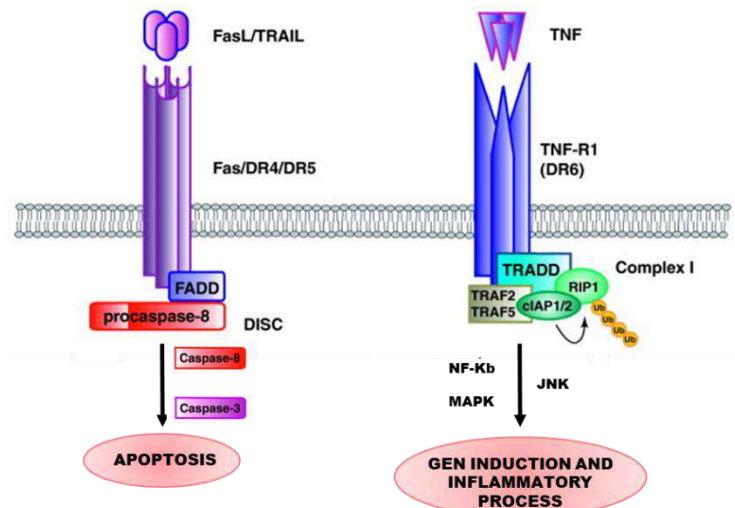


Figura 1.8 Representación esquemática de DISC y TNF-RSC. Modificado de “*Death receptor signalling in central nervous system inflammation and demyelination*”, Mc Guire, C. et al. (2011).

La estructura TNF-RSC consta de la proteína adaptadora TRADD (*TNF-R Associated Death Domain*), por cuyos dominios DD se asocian TRAF2 (*TNF Receptor-Associated Factor 2*) y RIP1 (*Receptor-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase 1*). A su vez, TRAF2 contiene sitios de unión para las proteínas cIAP1 y cIAP2. Estas proteínas pertenecen a la familia de E3 ubiquitina ligasas y se encargan de añadir diferentes cadenas de ubiquitina (K63 y K11) a lo largo de la secuencia de RIP1. La ubiquitinización del complejo permite la asociación de la proteína LUBAC (*Large Ubiquitin Binding Complex*) a la estructura, quien se encarga de añadir cadenas lineales de ubiquitina en diferentes localizaciones, permitiendo el reclutamiento de otros elementos como TAB/TAK (*TAK-Binding Protein/Transforming Growth Factor β -Activated Kinase*) o NEMO/IKK (*NF- κ B Essential Modulator/Inhibitor of κ B Kinase-c*) [67, 68]. La estructura establecida por el conjunto de todos los elementos descritos se denomina complejo I, y desempeña la función de inducir procesos pro-inflamatorios a través de la señalización vía NF κ B, MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) o JNK (*c-Jun N-terminal Kinases*) [69, 70] (Figura 1.8).

A pesar de que el complejo I es la principal forma de señalización, existen determinadas circunstancias por las que éste se modifica y constituye un complejo secundario. La ausencia de LUBAC, debido a la falta de ubiquitinización por parte de los cIAPs, produce el desacoplamiento del complejo I, liberando al citosol algunos componentes como las proteínas TRADD y RIP1. En el citosol RIP1 es capaz de reclutar otras proteínas como RIP3, FADD, caspasa-8 y cFLIP, constituyendo el complejo II. El grado de activación de la caspasa-8, regulado principalmente por los niveles de cFLIP, va a determinar el inicio de distintos programas de muerte celular, pudiendo desencadenar apoptosis o necroptosis, o incluso inducir señales de supervivencia (Figura 1.9).

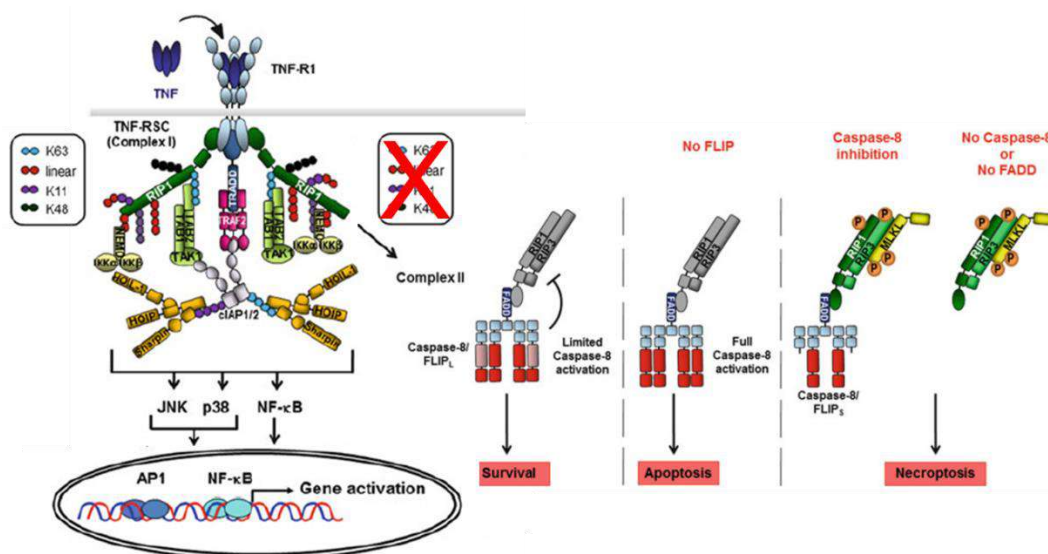


Figura 1.9 Representación esquemática de los complejos de señalización de TNF. Modificado de "Regulation of death receptor-induced necroptosis by ubiquitination", Darding, M. and Henning, W. (2014).

Por el contrario, la estructura que presenta DISC es mucho más sencilla e induce primordialmente señalización apoptótica [71-76]. La proteína adaptadora FADD (*Fas Associated Death Domain*) es la responsable de reclutar a las caspasas iniciadoras -8 y -10 e inducir su homodimerización y activación tras la unión del ligando trimerizado CD95L/FasL/Apo1L o Apo2L/TRAIL a sus correspondientes receptores (Figura 1.8). Las caspasas activas son liberadas al

citósol, donde ejercen su actividad proteasa sobre sus distintos sustratos. La caspasa-3 es la principal diana dentro de las caspasas efectoras, sin embargo, las caspasas-8 y -10 también pueden actuar sobre Bid, una proteína *BH-3 only*, generando una forma truncada (tBid) que va a ser el punto de conexión con la vía intrínseca de la apoptosis [77-79]. La proteína tBid interviene favoreciendo la dimerización de Bax y/o Bak en la superficie de la mitocondria, que produce la permeabilización (MOMP) y la consiguiente liberación de los elementos que permiten la formación del apoptosoma, ejecutándose así la apoptosis [80].

Dado que la apoptosis inducida por los ligandos mortales CD95L/FasL/Apo1L o Apo2L/TRAIL puede activarse por distintas rutas, se propuso una clasificación en base a la conexión con la ruta intrínseca [81-83]. Las células de tipo I se caracterizan por una activación suficientemente potente de la caspasa-8 que conduce al procesamiento de la caspasa-3 y con ello la ejecución directa del programa apoptótico. Sin embargo, las células de tipo II presentan una activación menor de la caspasa-8, lo que requiere la potenciación de la señal mediante la ruta mitocondrial para producir la muerte celular (Figura 1.10).

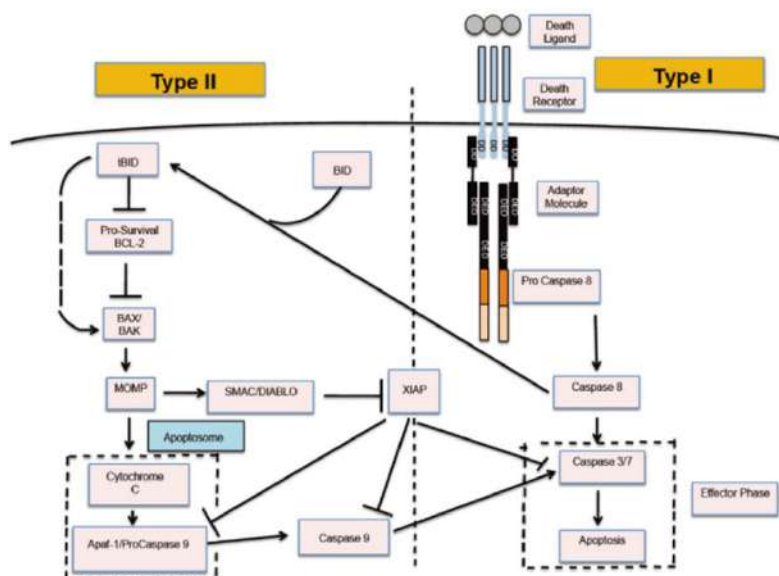


Figura 1.10 Representación esquemática de la conexión entre la ruta extrínseca e intrínseca de la apoptosis. “Monte Carlo Study elucidates the type 1/type 2 choice in apoptotic death signaling in healthy and cancer cells”, Raychaudhuri, S. and Raychaudhuri, S.C. (2013).

Aunque, como hemos descrito anteriormente, cada ligando mortal activa principalmente unos procesos celulares concretos, es importante destacar que tanto las plataformas de transducción de señal TNF-RSN como DISC son capaces de activar procesos pro-inflamatorios, apoptóticos o necroptóticos, en función de diversas variables como el contexto celular o la inhibición de distintos elementos en la cascada de señalización [66, 84-87].

1.1.2 Otros tipos de muerte celular programada: Necrosis programada

Durante décadas se consideró la apoptosis como la principal muerte celular en el ámbito fisiológico [14]. Sin embargo, descubrimientos posteriores desvelaron otros tipos de muerte celular con gran relevancia en la homeostasis de los tejidos, entre los que la necrosis juega un papel relevante [88-90]. La necrosis programada es un proceso de muerte celular genéticamente modulado y controlado, caracterizado por una granulación citoplasmática. Hay catalogados varios tipos de necrosis programada, como es la piroptosis o la necroptosis [90].

Existe una muerte celular programada dependiente de caspasas que, a diferencia de la apoptosis, se caracteriza por la liberación del contenido celular a la matriz extracelular, induciendo respuesta inflamatoria en la zona adyacente al tejido. Este proceso recibe el nombre de piroptosis [91, 92]. Ciertas señales, como patógenos intracelulares, inducen la activación de la caspasa-1, que se encarga de procesar citoquinas inflamatorias, concretamente IL-1 β y IL-18 (Figura 1.11). Así mismo, la caspasa-1 activa es capaz de procesar unas proteínas llamadas gasderminas que son las encargadas de producir la formación de poros en la membrana plasmática [93], generándose un gradiente de iones que conducirá a la lisis celular. A pesar de la rotura de la membrana plasmática, la integridad de la membrana nuclear se mantiene intacta, aunque se observa condensación de la cromatina [94].

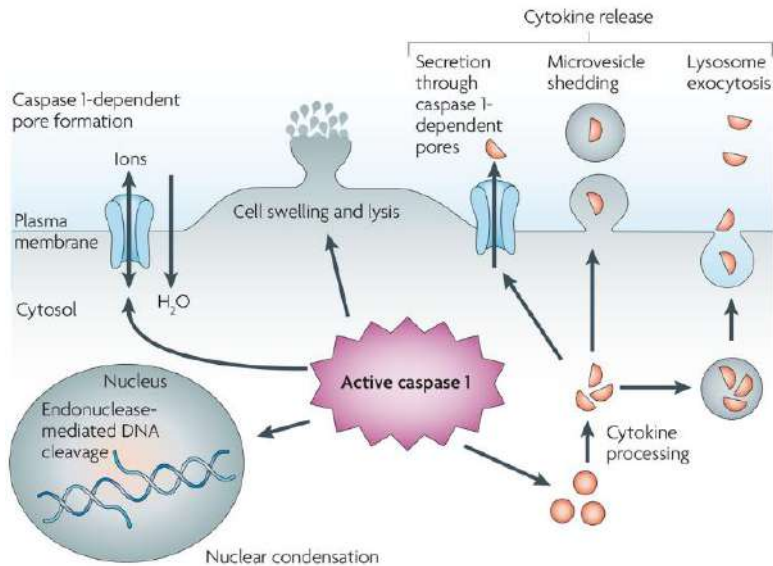


Figura 1.11 Representación esquemática del mecanismo de la piroptosis. “Pyroptosis: host cell death and inflammation”, Bergsbaken, T. et al. (2009).

Por otro lado, se ha descrito una muerte celular con características equivalentes a la necrosis, pero sometida a un elevado grado de control. Esta necrosis regulada se designó con el término de necroptosis [95, 96]. Los ligandos mortales han sido ampliamente estudiados como inductores de necroptosis en condiciones de bloqueo de la ruta apoptótica [95, 97, 98], siendo el receptor TNFR1 la vía de señalización de necroptosis mejor estudiada. La formación del complejo II con ausencia de actividad de la caspasa-8 es el desencadenante para la formación del necrosoma. El necrosoma es el complejo molecular central en la inducción de necroptosis, formado por FADD, caspasa-8, RIP1 y RIP3. Durante su formación, RIP1 recluta a la proteína RIP3 que va a oligomerizar gracias a fosforilaciones en su secuencia. A su vez, RIP3 recluta a MLKL (*Mixed Lineage Kinase Domain-Like Pseudokinase*), cuya fosforilación induce su oligamerización y migración a la membrana celular. Es allí donde se va a unir a través de la asociación con lípidos como fosfatidilinositol y cardiolipina induciendo la necrosis [99] (Figura 1.12).

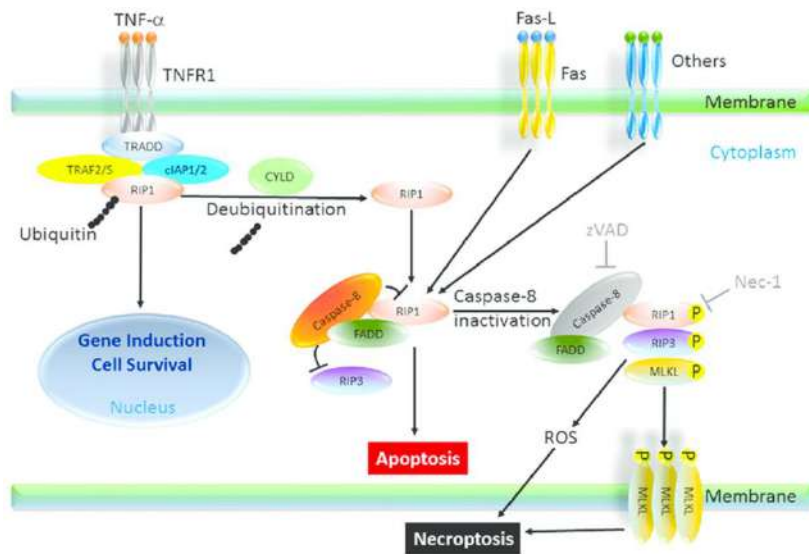


Figura 1.12 Representación esquemática de la señalización de necroptosis a través de ligandos mortales. “Cancer’s Achilles’ heel: apoptosis and necroptosis to the rescue”, Dasgupta, A. et al. (2016).

1.2 Apo2L/TRAIL

1.2.1 Estructura y función

Apo2L/TRAIL es un ligando mortal perteneciente a la familia TNF, expresado principalmente en células del sistema inmune como células dendríticas, monocitos, linfocitos o células NK (*Natural Killer*, asesinas naturales) [100-102].

Apo2L/TRAIL es una proteína transmembrana tipo II cuya secuencia está presente en el cromosoma 3, codificado por el gen *TNFSF10*. El monómero de Apo2L/TRAIL lo constituyen 281 aminoácidos, teniendo un peso molecular de 32,5 kDa. Presenta un sitio de corte para una proteasa específica, pudiéndose convertir el dominio extracelular en un fragmento soluble de un tamaño de 24 kDa. La agrupación de los monómeros de Apo2L/TRAIL en homotrímeros alrededor de un átomo de Zn, al que se unen a través de cisteínas, es clave en distintas propiedades de la molécula como la bioactividad, la estabilidad y la solubilidad [103-105] (Figura 1.13). Sin embargo, en linfocitos T activados se ha

observado que la Apo2L/TRAIL (al igual que el otro ligando mortal FasL) se presenta fisiológicamente en la forma transmembrana, asociada a unas vesículas lipídicas de un tamaño de 100-200 nm, denominados exosomas. Estas nanopartículas se almacenan en el citosol de las células, en unos orgánulos que se denominan cuerpos multivesiculares (MVB, del inglés, *Multivesicular Bodies*). Cuando se produce la re-activación del linfocito T, gracias a las correctas señales de estimulación, los MVB se fusionan con la membrana plasmática liberando al medio extracelular los exosomas con los ligandos mortales Apo2L/TRAIL y FasL anclados a su superficie, donde ejercerán su función de señalización sobre otras células [106, 107].

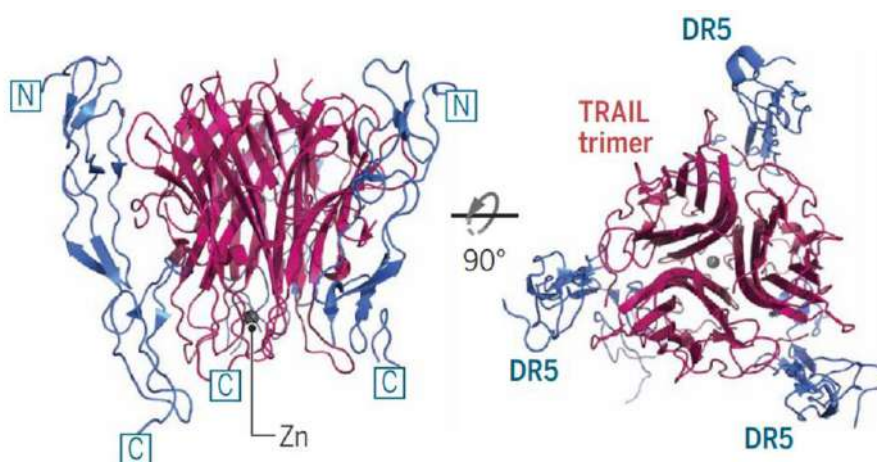


Figura 1.13 Representación estructural del complejo TRAIL-DR5. Tres monómeros de TRAIL conforman un trímero alrededor de un átomo central de Zn. La molécula se une a tres receptores DR5 para conformar el complejo ligando-receptor. Modificado de “*Structural principles of tumor necrosis factor superfamily signaling*”, Vanamee, E.S. and Faustman, D.L. (2018).

Aunque existen numerosos estudios en torno a la función biológica de Apo2L/TRAIL, aún no se conoce completamente el rol fisiológico de la proteína endógena en el organismo. La propiedad de inducir apoptosis en células transformadas fue descrita inicialmente cuando Apo2L/TRAIL se identificó por primera vez [108, 109]. Posteriores investigaciones con ratones deficientes en Apo2L/TRAIL y su receptor murino DR5, revelaron que la proteína no interfería en el proceso del desarrollo embrionario [110-112]. Sin embargo, en estadio adulto, los ratones presentaban mayor incidencia de enfermedades autoinmunes

experimentales inducidas [113-115]. A raíz de estos descubrimientos y dado que Apo2L/TRAIL está principalmente presente en células del sistema inmune, la regulación de la respuesta inmune fue la principal función postulada con respecto a Apo2L/TRAIL [116].

Posteriormente, se han encontrado evidencias científicas sobre un posible papel de Apo2L/TRAIL en la inmunovigilancia tumoral y metástasis. Se ha descrito la mayor susceptibilidad de ratones deficientes en Apo2L/TRAIL y DR5 al crecimiento de tumores inducidos químicamente o injertados [110, 112, 117]. También se ha observado que ratones deficientes en Apo2L/TRAIL presentan en edad adulta mayor riesgo de desarrollar tumores espontáneos, como la aparición de linfomas malignos [118]. En este ámbito, se ha observado que los niveles de expresión de la proteína p53 puede ser clave en el grado de desarrollo tumoral [118, 119]. En otros modelos animales con células de carcinoma, en los que se emplearon ratones deficientes en Apo2L/TRAIL y su receptor, se observó el desarrollo de nodos linfoides metastásicos [120]. Esta evidencia hizo poner el foco sobre el posible papel de Apo2L/TRAIL en el control de la capacidad metastásica tumoral, que posteriormente se confirmó con estudios empleando modelos experimentales de metástasis hepáticas [121]. Determinados estudios han correlacionado el papel anti-metastásico de Apo2L/TRAIL endógeno en pacientes de cáncer colorectal, donde la función protectora de Apo2L/TRAIL se ve favorecida por la sobreexpresión de uno de sus receptores en las células tumorales. En contraposición, se ha descrito que el complejo Apo2L/TRAIL-receptor es capaz de promover la progresión tumoral, migración y metástasis de células tumorales con mutaciones en genes específicos. Este hallazgo pone de manifiesto el sentido de la conservación de la expresión de los receptores de Apo2L/TRAIL por parte de las células tumorales, y explica la regulación positiva en ciertos tipos tumorales donde el binomio endógeno Apo2L/TRAIL-receptor presenta un efecto pro-tumorigénico [122, 123]. Sin embargo, a pesar de todos los indicios científicos encontrados, aún falta por discernir de forma completa y exacta el papel fisiológico de Apo2L/TRAIL en el ámbito del sistema inmune y el desarrollo tumoral.

1.2.2 Receptores

Se han descrito 5 receptores capaces de unirse al homotrímero de Apo2L/TRAIL, denominados como: DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2, DcR1/TRAIL-R3, DcR2/TRAIL-R4 y osteoprotegerina (OPG) [71, 124-126] (Figura 1.14). Los receptores DR4 y DR5 se caracterizan por ser proteínas transmembrana tipo I que disponen de dominios DD en la región citoplasmática, lo que les otorga la capacidad de iniciar la señalización intracelular una vez se forma el complejo ligando-receptor. En la región extracelular poseen varios dominios ricos en cisteína o CRD. Por el contrario, los receptores DcR1 y DcR2 a pesar de disponer de CRD, carecen de los dominios DD funcionales. La ausencia de estos dominios DD hace suponer que su función es la de actuar como señuelos, mecanismo por el cual la célula podría eludir la activación de la ruta apoptótica al secuestrar el ligando inductor [127]. Aunque ésta es la principal hipótesis de la función de éstos receptores, aún no se ha esclarecido por completo el motivo de su presencia en la superficie celular. Otros estudios han mostrado que DcR2 es capaz de formar un complejo de receptores inactivos al asociarse con DR5 e incluso activar la señalización de rutas de supervivencia a través de NF- κ B [128].

Por otro lado, a diferencia del resto de receptores de Apo2L/TRAIL, OPG es un receptor soluble. OPG es capaz de unirse a Apo2L/TRAIL, aunque con mucha menor afinidad que a otros ligandos de la familia TNF, como es el caso del ligando involucrado en la regulación del metabolismo óseo denominado RANKL (*Receptor Activator of NF- κ B Ligand*). Sin embargo, dado que los ratones con deficiencia de Apo2L/TRAIL y DR5 no muestran un fenotipo con alteración en el metabolismo óseo, es bastante improbable que la interacción Apo2L/TRAIL-OPG también pueda tener un papel en la señalización Apo2L/TRAIL, al menos *in vivo* en ratones [112, 129]. En lo referente al papel de OPG en tumorigénesis, aunque no se conoce con seguridad la función biológica de éste receptor, se ha observado que elevados niveles de OPG en ciertos tumores suponen un factor de supervivencia para las células tumorales [130].

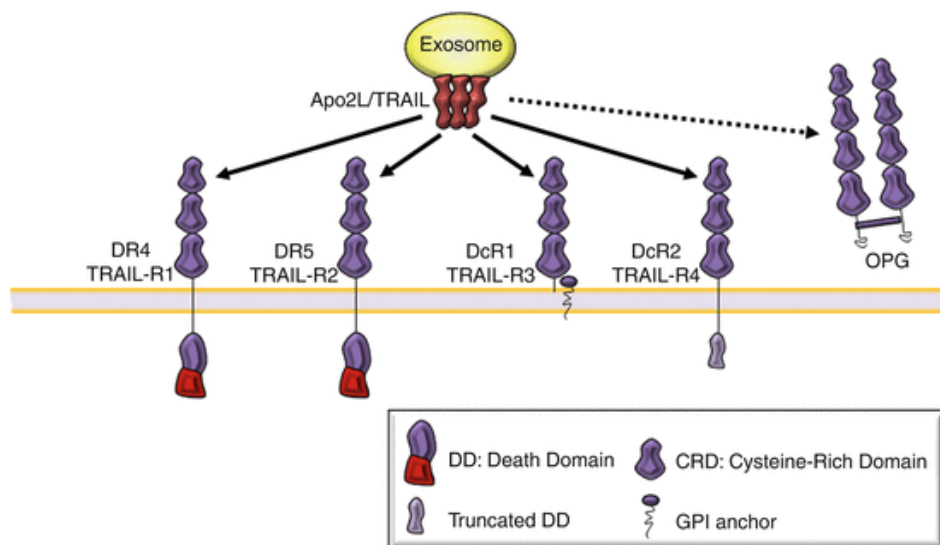


Figura 1.14 Representación esquemática de los distintos receptores descritos para Apo2L/TRAIL. "Encyclopedia of signalling molecules", Martínez-Lostao, L. et al. (2012).

En la superficie celular, de forma fisiológica los receptores se encuentran en complejos oligoméricos preformados, constituyendo homotrímeros [62, 63]. Esta formación ocurre gracias a las interacciones que se establecen entre los dominios PLAD, presentes en los CRD de los receptores. Se han descrito estas estructuras también en otros receptores mortales como Fas, donde se ha determinado que mutaciones en regiones de PLAD inhiben la inducción de apoptosis debido a la deficiente preformación de los homotrímeros del receptor [131]. Es por ello que parece que la correcta señalización apoptótica está estrechamente ligada a la oligomerización de los trímeros de receptor en estructuras supramoleculares [63, 64, 132]. Este tema se discutirá con mayor profundidad más adelante.

Los receptores DR4 y DR5 comparten la capacidad de señalizar la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL, sin embargo no son totalmente equivalentes ya que poseen diferencias en la afinidad por Apo2L/TRAIL y la activación del DISC con la consiguiente transducción de la señal apoptótica. Aunque aún no se sabe con seguridad la aportación que tiene cada receptor a la muerte inducida por Apo2L/TRAIL, parece depender del tipo celular en cada caso. Se ha observado

que el receptor DR5 tiene mayor relevancia en la muerte celular inducida por Apo2L/TRAIL en tumores del tipo epitelial [133, 134], mientras que DR4 es el principal señalizador de apoptosis en tumores sanguíneos como en algunos tipos de leucemia o en tumores pancreáticos [135-138].

Aunque, como se ha descrito anteriormente, la formación de un complejo macromolecular por parte de los receptores es clave, las diferencias en la capacidad de activación del DISC por parte de los dos receptores funcionales de Apo2L/TRAIL están estrechamente relacionadas con el entrecruzamiento (también llamado *cross-linking*) de Apo2L/TRAIL. El requerimiento de un determinado grado de *cross-linking* de Apo2L/TRAIL para la activación del DISC difiere para ambos receptores DR4 y DR5 [139]. A pesar de que DR5 tiene mayor afinidad por Apo2L/TRAIL que DR4 [140], la activación del DISC por parte de la proteína soluble es muy débil, por lo que una señalización intensa de la apoptosis es mediada por un mayor grado de entrecruzamiento de la molécula de Apo2L/TRAIL [141]. Por el contrario, la señal que media la proteína soluble a través de DR4 es suficiente para inducir apoptosis, ya que la activación del DISC a través de DR4 es independiente del nivel de entrecruzamiento [142, 143].

1.2.3 Oligomerización de los receptores para la correcta señalización de apoptosis

La inducción de la señalización apoptótica por los miembros de la familia TNF ha sido descrita en dos pasos clave. El primero de ellos consiste en la unión del ligando con el receptor. Como se ha expuesto anteriormente, tres moléculas de Apo2L/TRAIL se unen formando un homotrímero, donde el dominio THD es el responsable de la auto-asociación [144], generándose una estructura que se estabiliza por interacciones a través de cisteínas de cada monómero con un átomo de Zn [104, 145]. Sin embargo, la unión del trímero con tres moléculas de receptor no es suficiente para activar correctamente la cascada apoptótica, sino que se requiere una agrupación de los receptores en estructuras supramoleculares para que la señalización conlleve una ejecución apoptótica [146]. En este punto juega un papel clave la fijación espacial de los dominios THD

del ligando, que de forma fisiológica se produce por la asociación al dominio transmembrana de Apo2L/TRAIL, que se encarga de estabilizar el trímero a través de un mayor entrecruzamiento y otorgar una distribución espacial adecuada de las moléculas. Estas condiciones favorecen la posterior organización de los receptores en dichas agrupaciones supramoleculares [147]. La forma soluble de Apo2L/TRAIL carece de esta propiedad al no disponer del dominio transmembrana de la proteína, lo que explica que posea aparentemente una menor capacidad de señalización que la proteína asociada a una membrana lipídica. La propiedad de aumentar el potencial apoptótico a través del entrecruzamiento o *cross-linking*, con la consiguiente oligomerización de los receptores, también se ha comprobado en otros miembros de la familia TNF, como FasL [148] y TNF- α [149].

Los receptores de muerte, como hemos visto anteriormente, se encuentran agrupados en oligómeros pre-asociados a través de las regiones PLAD. Se han descrito dos modelos que describen la asociación de Apo2L/TRAIL a sus receptores en distintas formas de oligomerización [64] (Figura 1.15). El modelo de “cambio conformacional” describe la asociación de los receptores a través de PLAD en forma de trímeros, capaces de asociar sus dominios DD tras los cambios conformacionales producidos por la unión del ligando. El otro modelo, conocido con el nombre de “inducción de súper agrupación”, establece que los receptores de muerte se agrupan como dímeros a través de PLAD, siendo la unión de Apo2L/TRAIL a tres receptores lo que induce el reclutamiento de otros receptores adyacentes formando una estructura supramolecular.

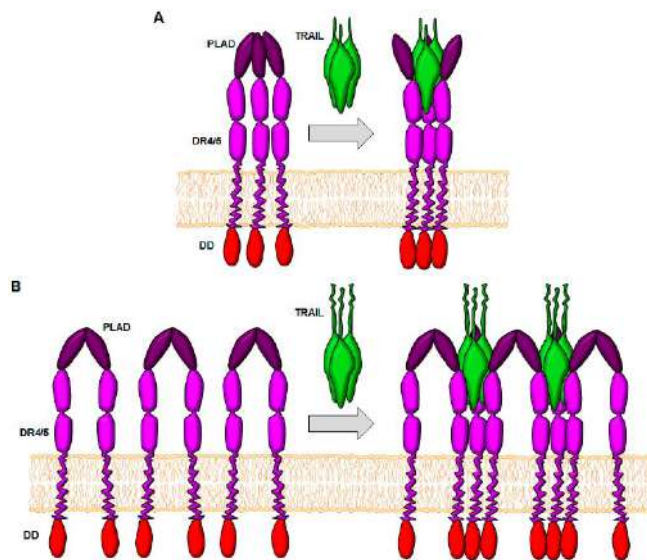


Figura 1.15 Representación esquemática de los modelos de interacción de los oligómeros preformados de los receptores de muerte y Apo2L/TRAIL. A. Modelo de “cambio conformacional”. **B.** Modelo de “inducción de súper agrupación”. “*Importance of TRAIL molecular anatomy in receptor oligomerization and signaling. Implications for cancer therapy*”, Naval, J. et al. (2019).

La unión de Apo2L/TRAIL a los receptores de muerte, formando el complejo ligando-receptor, es el elemento inductor de la correcta trimerización de los receptores y de los posteriores cambios conformacionales que tendrán lugar en los DRs para el correcto reclutamiento del DISC, lo que incluye la agrupación de los complejos en un orden superior. Esta oligomerización en estructuras supra-moleculares en la superficie celular es requerida por determinados receptores mortales para iniciar eficientemente la señalización apoptótica intracelular [143, 150], que de forma fisiológica se logra a través del ligando mortal asociado a la membrana plasmática de las células efectoras del sistema inmune o en la superficie de membrana de los exosomas [106, 151]. En este proceso de trimerización, recientemente se ha descrito que la región responsable de la agrupación del receptor DR5 es la llamada hélice transmembrana (TMH) [152]. La agrupación a través de estos dominios resulta en la formación de una red dímero-trímero de receptores, generándose unas estructuras de orden superior que permiten un reclutamiento más eficiente de las proteínas del complejo intracelular [150, 153, 154]. De esta forma se produce una activación del DISC mucho más

potente que termina induciendo una óptima señal apoptótica (Figura 1.16). El complejo macromolecular que se forma en la superficie celular se conoce con el nombre de “panel de abeja”, debido a su estructura hexagonal [154].

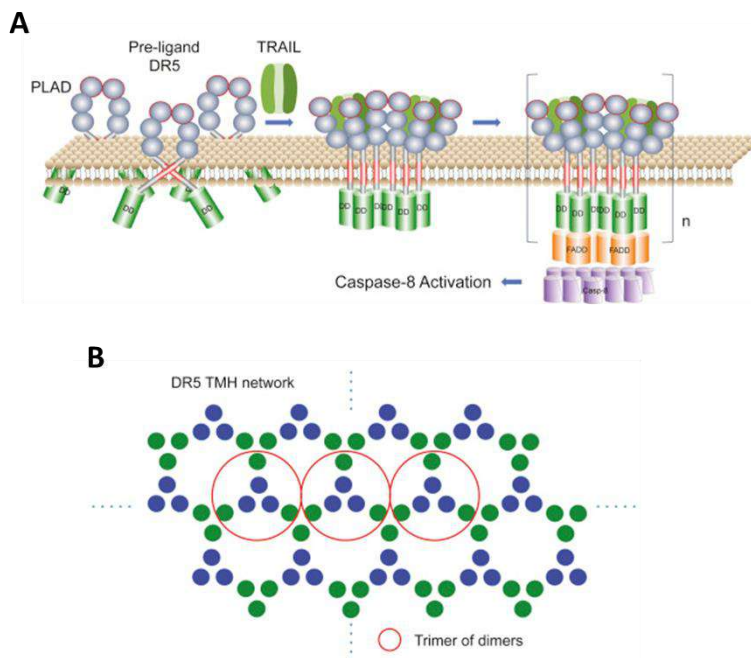


Figura 1.16 Representación esquemática de la estructura oligomerizada de los receptores DR5 inducida por la unión de Apo2L/TRAIL. A. Modelo de unión de Apo2L/TRAIL a los receptores preformados, induciendo la asociación de orden superior de los receptores y con ello una formación de DISC más eficiente. El proceso se traduce en una activando más potentemente la caspasa-8. **B.** Representación de la estructura en forma de panel de abeja generado por las asociaciones diméricas de trímeros de receptor a través de la región TMH de DR5. Modificado de “Higher-order clustering of the transmembrane anchor of DR5 drives signaling”, Pan, L. et al. (2019).

Se ha postulado que el mecanismo que subyace a la mayor eficiente activación del DISC otorgado por la agrupación de receptores en un orden estructural superior, es un mayor reclutamiento de la caspasa-8 en el DISC. La caspasa-8 se asocia no sólo a la proteína adaptadora FADD sino que crea interacciones homotípicas entre las regiones DED, generando cadenas de moléculas caspasa-8 denominadas “DED chains” [154]. Estudios posteriores identificaron que otras moléculas portadoras de regiones DED, como caspasa-10 y cFLIP, intervienen también en la formación y regulación de estos complejos proteicos [155, 156].

Sin embargo, la oligomerización y organización supramolecular descrita no es requerida por todos los receptores mortales para la inducción de apoptosis por sus correspondientes ligandos. Se ha descrito que la forma soluble de TNF- α es capaz de inducir la señalización intracelular cuando se une a través del receptor TNF-R1, sin embargo, se requiere la conformación transmembrana del ligando para activar la señal por TNF-R2 [157]. De forma similar ocurre con los receptores mortales de Apo2L/TRAIL, donde el receptor DR5 es fundamentalmente capaz de activar la apoptosis cuando interactúa con la forma transmembrana de Apo2L/TRAIL o estructuras del ligando con alto nivel de entrecruzamiento, mientras que DR4 es activo al interactuar con la forma soluble. Se ha descrito que este hecho tiene relación con la disposición de los receptores en localizaciones concretas de la membrana plasmática. El receptor DR4 debe estar situado en los *lipid rafts* o balsas lipídicas para iniciar la señalización inducida por la forma soluble de Apo2L/TRAIL, lo que indica que la oligomerización de los receptores está facilitada por su localización en las balsas lipídicas, generándose una formación adecuada del DISC sin necesidad de que el ligando presente elevado grado de entrecruzamiento. Por el contrario, DR5 no requiere una estricta localización en las balsas lipídicas para su activación, lo que hace que dependa de la forma transmembrana del ligando o un entrecruzamiento adicional para la formación de *clusters* de receptores que induzcan la adecuada formación del DISC [158, 159].

El descubrimiento de una activación diferencial de los receptores mortales por parte de las formas soluble y transmembrana de los ligandos mortales permite describir un mecanismo adicional de regulación de la actividad de estos ligandos. En este sentido, se ha demostrado que la escisión de FasL de la membrana plasmática por parte de una metaloproteasa, convirtiéndose en su forma soluble, produce una regulación negativa del potencial pro-apoptótico del ligando mortal [148, 160].

Además, la presencia de Apo2L/TRAIL no sólo es clave para señalar la inducción de apoptosis, sino que se ha constatado que la presencia del ligando aporta una triple simetría en la unión de los tres receptores al complejo,

estabilizándose así correctamente el trímero. Sin embargo, DR5 tiene una fuerte predisposición a formar trímeros en ausencia de Apo2L/TRAIL mediante uniones a través del dominio próximo a membrana. Esta propensión a la auto-asociación genera la pérdida de triple simetría, conllevando así una reducción en la intensidad en la señalización apoptótica [161].

Así mismo, otro factor que influye en la eficiente formación de complejos ligando-receptor, es el número relativo de los diferentes receptores mortales presentes en superficie. Ante el desequilibrio en la cantidad relativa de alguno de los receptores, se formarán complejos no activos que retrasarán la formación de los complejos activos y con ello la transducción de la señal apoptótica [162]. Además, también se producen formaciones no homoméricas de los receptores, que interfieren en la eficiencia y la regulación de la señalización del ligando mortal. Se ha descrito que DR4, DcR1 y DcR2 son capaces de interactuar homofílica y heterofílicamente en la superficie celular generando complejos pre-asociados en ausencia Apo2L/TRAIL [64]. Estos procesos de hetero-oligomerización podrían regular y modular la inducción de señalización intracelular, como se ha descrito en otros miembros de la familia de receptores mortales [163]. Así mismo, este proceso de regulación explica la presencia de DcRs en células normales como mecanismo de regulación negativa de la apoptosis.

1.2.4 Mecanismos de regulación de la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL

La apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL conlleva la activación de una cascada de señalización con resultado irreversible. Dado que la apoptosis, junto con la proliferación celular, forma parte de un balance que determina la homeostasis tisular, la regulación de estos procesos resulta clave para mantener dicho equilibrio homeostático. Esta regulación se lleva a cabo a distintos niveles: secreción del ligando Apo2L/TRAIL, modificaciones post-traduccionales de los DRs, localización de los receptores en la membrana, formación del DISC y activación de la ruta mitocondrial.

Como bien es conocido, las células tumorales presentan diversos mecanismos de evasión de la apoptosis, es por ello que el conocimiento de los mecanismos de regulación de apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL es clave para el desarrollo de terapias capaces de superar dicha resistencia a la muerte celular.

1.2.4.1 Regulación de la secreción de Apo2L/TRAIL

Apo2L/TRAIL, al igual que otros miembros de la familia TNF como FasL, son proteínas transmembrana que pueden liberarse al medio extracelular en su forma soluble. De ello se encargan unas metaloproteasas específicas, que escinden una región concreta liberando el dominio extracelular. Se ha descrito la metaloproteasa ADAM10 como la enzima responsable del proceso de secreción de la forma soluble de FasL [164], constituyendo un proceso de regulación negativa para la inducción de apoptosis en células sanas [160], aunque también utilizado por las células transformadas para evadir al sistema inmune [165, 166].

Aunque el mecanismo de escisión ha sido descrito para FasL, aún existe mucha controversia en el caso de Apo2L/TRAIL. Se ha descrito una posible función de proteólisis de la metaloproteasa MMP2 *in vitro* [167, 168], sin embargo no se han encontrado evidencias de su presencia *in vivo*. Otros investigadores defienden que inhibidores de MMP2 no interfieren en la secreción de Apo2L/TRAIL soluble, lo que indica que la escisión no se llevaría a cabo por una metaloproteasa sino por cisteína proteasas [169].

Como se ha explicado con anterioridad, aunque los ligandos mortales presentan una forma soluble, el modo principal en el que las células citotóxicas lo liberan para ejercer su función de forma biológica es asociado a vesículas lipídicas caracterizadas como exosomas que se almacenan en el citosol dentro de los MVB [106, 107, 170]. La movilización de los MVB hacia la membrana plasmática para la liberación de los exosomas viene regulada por señales de reestimulación en los linfocitos T activados. Se ha observado como la reestimulación a través del TCR en los linfocitos T previamente activados induce la secreción de FasL y Apo2L/TRAIL asociados a la superficie de exosomas,

mientras que la señalización a través de CD59 produce una liberación más específica de exosomas con Apo2L/TRAIL [171].

1.2.4.2 Modificaciones post-traduccionales de los receptores de Apo2L/TRAIL

Existen dos tipos de modificaciones post-traduccionales que afectan a los DRs, aportándoles propiedades mejoradas para su función señalizadora: glicosilación y palmitoilación.

El proceso de O-glicosilación ha sido descrito en los receptores DR4 y DR5 y supone un factor necesario para favorecer la agrupación de los receptores en complejos oligoméricos, imprescindible para dar estabilidad a los receptores en la membrana, el óptimo reclutamiento de proteínas y la activación del DISC [172, 173]. Por otro lado, la L-palmitoilación se ha constatado sólo en el receptor DR4, lo que le aporta la propiedad de localizarse en unas regiones específicas de la membrana, llamadas balsas lipídicas (*lipid rafts*), además de estabilizar la agregación de los receptores [174].

1.2.4.3 Regulación en la presencia de los receptores de Apo2L/TRAIL en la membrana plasmática

Como se acaba de mencionar, existen unas regiones específicas de la membrana plasmática donde se concentran los receptores mortales, conocidas como balsas lipídicas o *lipid rafts* [175, 176]. Estas zonas de la membrana presentan en su composición una elevada concentración en esfingomielina y colesterol, lo que les asigna una propiedad peculiar en la fluidez, presentando una fase con aspecto más gelificado que el resto de regiones de la membrana. El hecho de concentrar en una región concreta de la superficie la mayoría de los receptores mortales, favoreciendo la oligomerización en estructuras superiores, parece ser el cometido principal de los *lipid rafts*. Diversos autores han correlacionado la sensibilidad a la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL en líneas tumorales hematológicas de células B y de pulmón, con la presencia de los receptores mortales en las balsas lipídicas [159, 177, 178]. También se ha

comprobado que la inhibición de la traslocación de los receptores mortales a los *lipid rafts* es un posible mecanismo de evasión de la apoptosis por parte de las células transformadas [177, 179].

Otro factor que afecta a la presencia de los receptores mortales en la membrana plasmática es la endocitosis. Se han observado dos tipos de endocitosis en la regulación de las rutas de señalización: dependiente de dinamina (puede ser mediada por clatrina o caveolina) e independiente de dinamina [180, 181]. La dinamina (GTPasa dinamina) es una enzima encargada de liberar al citosol las estructuras formadas de invaginaciones de la membrana plasmática arbitradas por moléculas de clatrina o caveolina. Por el contrario, en los casos donde la dinamina no es requerida para la escisión, los *lipid rafts* juegan un papel clave (Figura 1.17).

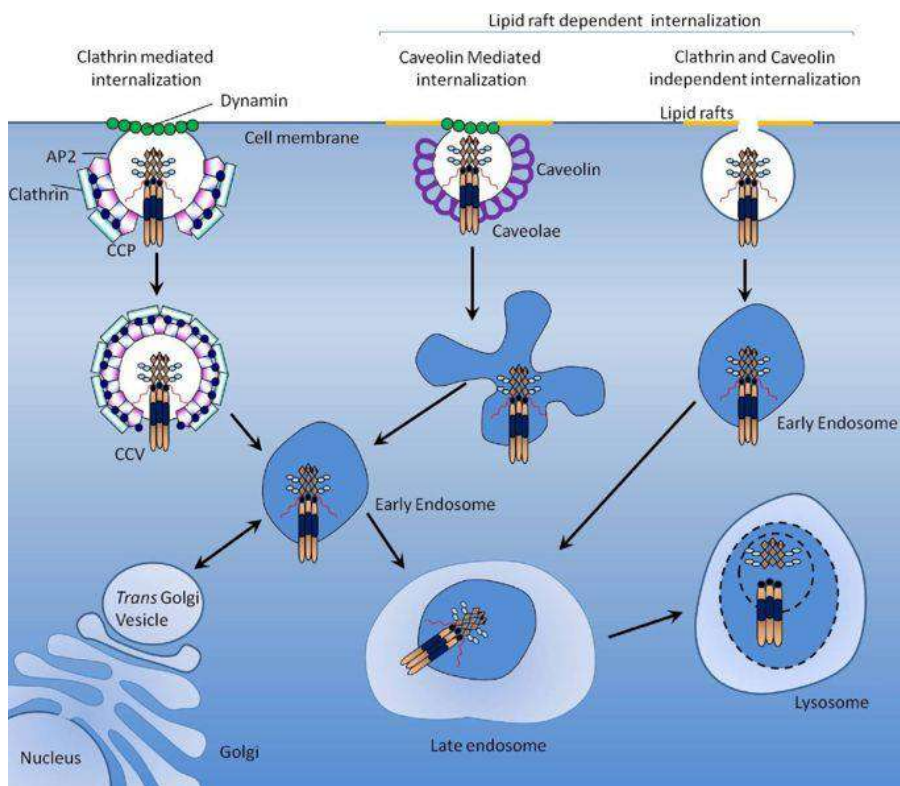


Figura 1.17 Representación esquemática de los distintos tipos de endocitosis que sufren los receptores mortales. “*TRAIL and vitamins: opting for keys to castle of cancer proteome instead of open sesame*”, Farooqi, A.A. et al. (2012).

El proceso de internalización de complejos ligando-receptor tiene diversas funciones biológicas. En el caso de FasL y TNF- α , su unión al receptor promueve una rápida internalización de los receptores que conduce a la formación de complejos secundarios necesarios para potenciar la señalización apoptótica (siendo una endocitosis dependiente de clatrina). También es conocido el papel de la endocitosis como mecanismo de eliminación de la inducción de señalización celular, ya que el destino de los complejos ligando-receptor, una vez endocitados, será la degradación lisosomal, que además permite el reciclado de los receptores.

En el caso concreto de Apo2L/TRAIL, existe controversia en el papel de la internalización de los receptores y la señalización de Apo2L/TRAIL. Se ha observado que la internalización del receptor DR5 mediante la endocitosis supone una pérdida del efecto citotóxico de Apo2L/TRAIL [182, 183]. Por el contrario, otros autores han descrito que la internalización del mismo, con la consiguiente permeabilización lisosomal favorece en la potenciación de la señal apoptótica en diversas líneas celulares malignas de hígado [184]. Por otro lado, existe otra teoría que defiende que la endocitosis ocurre como un evento secundario, sin que influya en la señalización de apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL [185], o incluso que la misma unión del ligando al receptor produce la inhibición de la endocitosis [186].

También se ha descrito la internalización de los receptores de Apo2L/TRAIL como un posible mecanismo de evasión de la apoptosis por parte de las células transformadas [182, 184, 187].

1.2.4.4 Regulación a nivel de formación del DISC

La caspasa-8, como elemento clave en la formación del DISC y activación de la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL, es una diana importante en la regulación de la apoptosis inducida por dicho ligando mortal. Existen procesos de ubiquitinización de la caspasa-8, llevados a cabo por CUL3 (*Cullin-3*) y DUB (deubiquitinasa) A20, presentes en el DISC, que se encargan de asociar o quitar cadenas de ubiquitina K48 y K63 a la caspasa-8 en la región C-terminal. Estas modificaciones favorecen la traslocación de la caspasa-8 a localizaciones

concretas, favoreciendo una elevada concentración local que permite su completa activación y actividad proteolítica [188].

Como ya se describió anteriormente, existe otra proteína similar a la caspasa-8 capaz de unirse al DISC a través de las regiones DED, regulando su activación, denominada FLIP. Mediante *splicing* alternativo del RNAm, cFLIP puede presentar tres isoformas diferentes, siendo las principales cFLIP_s y cFLIP_L. Ambas isoformas se han descrito como elementos de regulación negativa en la activación de apoptosis, siendo el mecanismo de inhibición competitiva el que interviene ante la unión a FADD frente a la caspasa-8 [33]. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las cantidades estequiométricas de las moléculas caspasa-8, cFLIP_s y cFLIP_L van a influir en el modo de regulación [189] (Figura 1.18). En este sentido, los niveles de las distintas isoformas de cFLIP varían de forma específica en función del tipo celular y en respuesta a diferentes estímulos. Esos estímulos pueden inducir modificaciones en las concentraciones de cFLIP a diferentes niveles mediante: regulación genética con la inducción de la expresión a través del factor de transcripción NF-κB [190], o bien mediante la degradación de la proteína en el proteasoma [191]. Todo ello hace que la proteína cFLIP se constituya como un potente mecanismo de regulación de la resistencia a la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL.

Aunque la función anti-apoptótica se considera el papel principal de cFLIP, se han descrito funciones adicionales para la isoforma cFLIP_L, siendo los niveles de expresión los determinantes para su actividad. Elevados niveles de expresión de cFLIP_L van a ejercer una inhibición de la apoptosis de forma equivalente a la isoforma cFLIP_s [33], sin embargo, la formación de heterodímeros activos con la caspasa-8 y -10 va a producir una especificidad de sustrato, dirigiendo una actividad proteolítica localizada [192-196]. Este mecanismo se ha descrito como el responsable de una regulación negativa de la necroptosis [84, 192, 197].

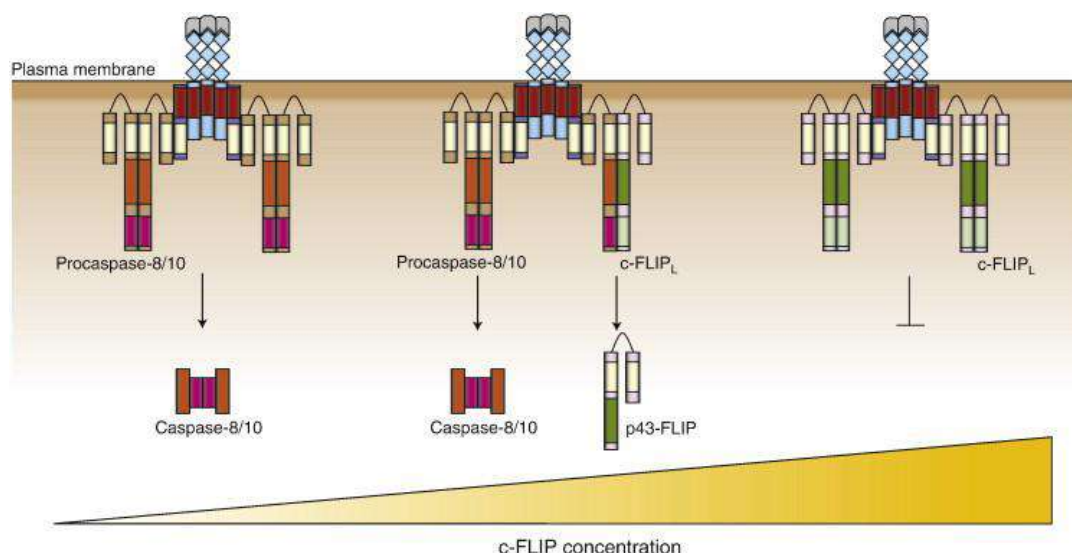


Figura 1.18 Representación esquemática de la composición del DISC y la actividad proteolítica de la caspasa-8/10 en función de los niveles de cFLIP intracelulares. “Cellular FLICE-like inhibitory proteins (c-FLIPs): Fine-tuners of life and death decisions”, Öztürk, S. et al. (2012).

El papel de regulación de la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL a través de cFLIP es utilizado tanto por las células transformadas como por las células normales. En el caso de las células tumorales, se ha descrito que elevados niveles de cFLIP previenen la muerte celular inducida por Apo2L/TRAIL en diversas líneas celulares provenientes de cáncer de pulmón [198], cáncer de colon [199] o cáncer de mama [200, 201]. Algunas células sanas utilizan altos niveles de expresión de cFLIP_L para bloquear la activación de caspasa-8 y con ello la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL, adquiriendo así un papel de supervivencia [202, 203]. Además, se ha correlacionado la expresión de cFLIP_L con la expresión de DR5, observándose un aumento en los niveles de DR5 cuando hay una disminución en la expresión de cFLIP_L en células epiteliales de mama no transformadas, lo que conduce a una apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL endógeno [202]. Todas estas evidencias permiten demostrar que cFLIP regula rutas de señalización inducidas por Apo2L/TRAIL.

El conocimiento de la implicación de cFLIP en el bloqueo de la apoptosis ha sido clave para desarrollar terapias que sensibilicen a la muerte inducida por

Apo2L/TRAIL a través de la disminución en los niveles de la proteína presentes en las células tumorales. De esta forma se ha conseguido sensibilizar con éxito células tumorales de diversos orígenes [201, 203-212].

1.2.4.5 Regulación a nivel de la vía intrínseca

En células clasificadas como de tipo II, la señalización a través de la vía mitocondrial es necesaria para la inducción de apoptosis mediada por el ligando mortal Apo2L/TRAIL. Por tanto, los distintos factores que regulan la vía intrínseca de la apoptosis también se ven implicados en la regulación de la vía extrínseca en las células de tipo II.

En este punto, los miembros de la familia Bcl-2 juegan un papel clave, de modo que altos niveles de proteínas anti-apoptóticas, como Mcl-1 [213], Bcl-2 [214] y Bcl-xL [215] son los responsables de la resistencia a la inducción de muerte celular mediada por Apo2L/TRAIL en distintas líneas celulares. El mismo resultado tiene niveles bajos de proteínas pro-apoptóticas como Bax [216]. Además, se ha constatado que el empleo de diferentes moléculas que interfieren en la expresión o en las interacciones de las proteínas de la familia Bcl-2, como moléculas siRNA o inhibidores BH3 (BH3I), generan un efecto sinérgico en el tratamiento con Apo2L/TRAIL, produciendo una sensibilización a la muerte celular inducida por el ligando mortal en determinadas células tumorales [55, 217].

1.2.5 Ruta no canónica de Apo2L/TRAIL

Apo2L/TRAIL, como otros miembros de la familia TNF, es capaz de activar señalizaciones diferentes a la apoptosis. Esto es conocido como la ruta no canónica de Apo2L/TRAIL e incluyen mecanismos pro-inflamatorios además de la necroptosis.

Al igual que se ha observado con TNF- α , en determinadas circunstancias la unión de Apo2L/TRAIL a su receptor induce la formación de un complejo secundario tras la formación del DISC [218]. Esta estructura, denominado complejo II, está constituida por los componentes iniciales del DISC (FADD, caspasa-8 y cFLIP) además de las proteínas RIP1, TRAF2 y NEMO [66, 87, 218,

219]. La constitución de este multi-complejo proteico activa rutas a través de NF- κ B, MAPK y JNK que pueden llegar a inducir no sólo inflamación, sino también señales de supervivencia y proliferación en células resistentes a la muerte inducida por Apo2L/TRAIL [220] (Figura 1.19).

También se ha observado una relación entre la activación de la ruta no canónica y la capacidad de proliferación, migración e invasión en determinadas células tumorales, donde elementos como Akt y ERK juegan un papel relevante en la señalización [221]. A pesar de todo, aún se desconoce con exactitud el significado biológico de la ruta no canónica de Apo2L/TRAIL.

Por otro lado, en situaciones donde está bloqueada la apoptosis debido a la inhibición de caspasas, al igual que para los otros miembros de la familia TNF, Apo2L/TRAIL es capaz de inducir necroptosis en determinadas líneas celulares [222].

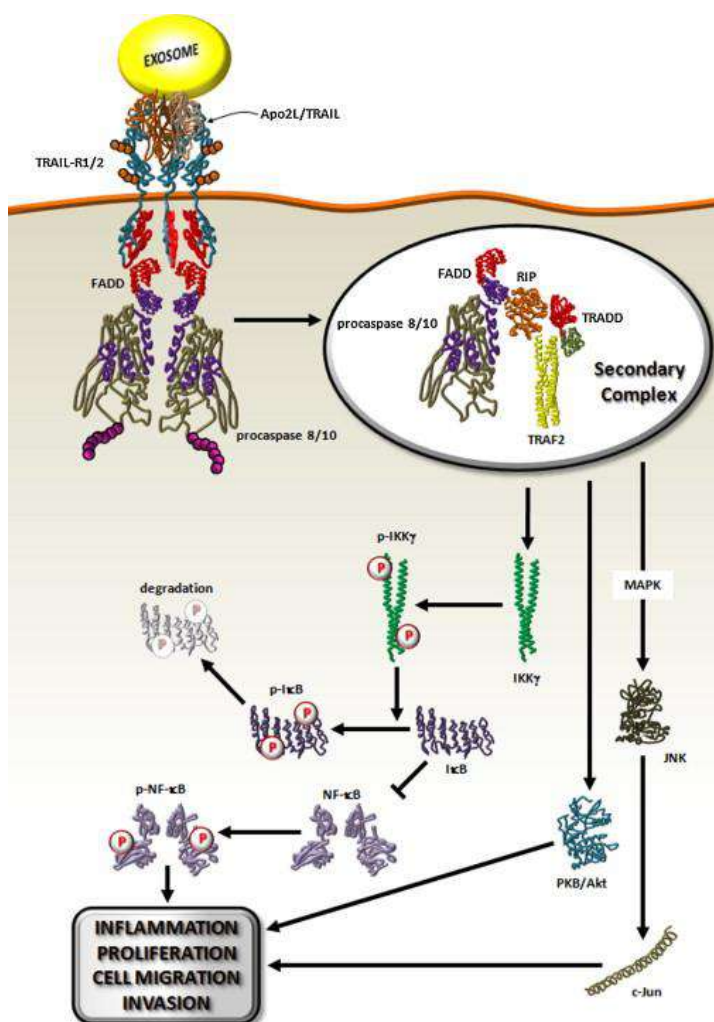


Figura 1.19 Representación esquemática de la ruta no canónica de Apo2L/TRAIL. “Targeting the Apo2L/TRAIL system for the therapy of autoimmune diseases and cancer”, Martínez-Lostao, L. et al. (2012).

1.3 Terapias anti-tumorales basadas en Apo2L/TRAIL

La proteína Apo2L/TRAIL, así como las moléculas basadas en ella, se han considerado prometedores candidatos como tratamiento contra el cáncer, dada su capacidad de inducir apoptosis en células transformadas sin afectar a células sanas [108, 109]. A diferencia del tratamiento con FasL o TNF- α que mostró una hepatotoxicidad letal in vivo, lo que descartó su utilización en terapia clínica para el tratamiento anti-tumoral [223], Apo2L/TRAIL mostró un elevado grado de

seguridad en modelos animales, abriendo así la puerta al desarrollo de terapias basadas en esta proteína [224].

Hasta la fecha, se han desarrollado ensayos clínicos basados en la molécula recombinante de Apo2L/TRAIL y anticuerpos agonistas específicos para DR4 o DR5 [225-230] (Tabla 1.1). A pesar de los buenos resultados preclínicos obtenidos y aunque en los ensayos clínicos sí se demostró que las terapias basadas en Apo2L/TRAIL eran seguras, en la mayoría de ellos no se observó que los tratamientos basados en esta molécula fueran eficaces como terapia anti-tumoral [231]. Se ha considerado que la principal causa del fracaso de los fármacos utilizados en los ensayos clínicos fue el bajo nivel de *cross-linking*, que no permitía alcanzar el grado necesario de oligomerización de los receptores y con ello, la correcta activación de la apoptosis [232].

Tanto la proteína recombinante Apo2L/TRAIL como los anticuerpos agonistas de los receptores DR4 y DR5, presentan características y propiedades específicas que otorgan ventajas e inconvenientes para el tratamiento anti-tumoral. Por un lado, la proteína recombinante soluble, conocida con el nombre comercial de Dulanermin®, es capaz de inducir la apoptosis a través de los dos receptores funcionales DR4 y DR5, sin embargo, también se puede unir a los receptores señuelo formando complejos inactivos, reduciendo así la concentración de proteína libre y perdiendo eficacia en la señalización de apoptosis. Además, la estabilidad y farmacocinética que presenta la molécula en sangre no es muy favorable como tratamiento, teniendo una vida media de 3-5 minutos en roedores y 23-31 minutos en simios no humanos [233].

Por el contrario, los anticuerpos agonistas específicos de los receptores de Apo2L/TRAIL proporcionan una diana concreta, pudiendo actuar sobre el receptor DR4 o DR5, evitando interacciones indeseadas con otros receptores celulares del ligando mortal. Dado que la contribución de cada receptor a la inducción de apoptosis por Apo2L/TRAIL varía dependiendo del tipo de célula tumoral, aplicar el tratamiento dirigido hacia el receptor específico que mayor señalización de apoptosis aporta supondría una mayor eficacia y optimización de la terapia anti-

tumoral. Además, el perfil farmacocinético de los anticuerpos agonistas de los receptores de Apo2L/TRAIL presenta mejores valores en los parámetros de vida media en comparación con la proteína soluble, detectándose niveles de los mismos en sangre durante varios días o incluso semanas tras la administración [234].

Se han desarrollado diversos anticuerpos agonistas específicos para DR4, como mapatumumab, así como para DR5, conocidos como drozitumab, tigatuzumab, conatumumab y lexatumumab. Diversos estudios han demostrado la necesidad de una reticulación adecuada en estos anticuerpos agonistas de receptores para la óptima señalización apoptótica tanto *in vitro* como *in vivo* [235-237]. Esta reticulación es mediada de forma fisiológica por los receptores Fcγ (FcγR), presentes en la superficie de la membrana plasmática de células del sistema inmune [238, 239], aunque también se puede llevar a cabo mediante agentes externos. Este hecho hace que la eficacia del tratamiento dependa de una reticulación adicional artificial o directamente de los niveles de expresión de FcγR por parte de las células del microambiente tumoral.

Tabla 1.1 Ensayos clínicos de terapias basadas en Apo2L/TRAIL. Modificado de “*Developing TRAIL/TRAIL-death receptor-based cancer therapies*”, Yuan, X. et al. (2018).

Formulación	Tratamiento combinado	Enfermedad	Identificación
Mapatumumab (anticuerpo monoclonal contra TRAIL-R1)	Sorafenib	Carcinoma hepatocelular avanzado	NCT01258608
	Sorafenib	Carcinoma hepatocelular avanzado	NCT00712855
	Bortezomib	Mieloma múltiple	NCT00315757
TRM-1 o HGS-ETR1 (anticuerpo monoclonal contra TRAIL-R1)	-	Linfoma no Hodgkin's	NCT00094848
HGS-ETR2 (anticuerpo monoclonal contra TRAIL-R2)	Interferón gamma 1b	Tumores sólidos	NCT00428272
Conatumumab (anticuerpo monoclonal contra TRAIL-R2)	FOLFOX6 o Ganitumumab o Bevacizumab	Tumores sólidos avanzados	NCT01327612
Tigatuzumab (anticuerpo monoclonal contra TRAIL-R2)	Abraxane	Cáncer de mama metastásico triple negativo	NCT01307891
DS-8273a (anticuerpo contra TRAIL-R2)	Nivolumab	Cáncer colorrectal avanzado	NCT02991196
	Nivolumab	Melanoma estadio III o IV	NCT02983006
AMG 655 (anticuerpo monoclonal contra TRAIL-R2)	AMG 479 (anticuerpo monoclonal humano contra IGF-1R) o Gemcitabine	Cáncer pancreático metastásico	NCT00630552
	AMG 479	Tumores sólidos	NCT00819169
	Doxorrubicina	Sarcoma de tejidos blandos	NCT00626704
	Vorinostat o Bortezomib	Linfoma de bajo grado	NCT00791011
AMG 951 (TRAIL recombinante humano)	Bevacizumab, Carboplatino, Paclitaxel	Cáncer de pulmón de células no pequeñas	NCT00508625
Dulanermin (TRAIL recombinante humano)	Placebo	Cáncer de pulmón de células no pequeñas estadio IV	NCT03083743
SCB-313 (TRAIL recombinante humano-trímero de proteína fusionada)	-	Efusión pleural maligna	NCT03869697
MSC-TRAIL	Placebo	Adenocarcinoma de pulmón	NCT03298763

Dadas las limitaciones observadas en los diferentes tratamientos anti-tumorales desarrollados basados en Apo2L/TRAIL, la administración en forma de monoterapia no parece ser una opción adecuada de tratamiento. Uno de los principales motivos que explican la baja eficacia clínica, además del bajo grado de entrecruzamiento y activación de los receptores por parte de las moléculas ensayadas, son los altos niveles de resistencia al efecto anti-tumoral de Apo2L/TRAIL de las células transformadas. La resistencia a la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL está presente de forma intrínseca en la mayor parte de células cancerosas provenientes de tumores primarios [215, 240, 241], sin embargo, esta resistencia también puede ser adquirida tras una exposición repetida a Apo2L/TRAIL [242].

Las células tumorales resistentes a Apo2L/TRAIL desarrollan diversos mecanismos para evadir la señal apoptótica inducida por el ligando mortal [243]. En este punto, la alteración en las vías de señalización apoptótica, así como la activación de moléculas inhibidoras de la apoptosis juegan un papel clave en el mecanismo que subyace a la resistencia a Apo2L/TRAIL [244]. La disfunción en la transmisión de señal apoptótica a nivel de receptores mortales (debido a los bajos niveles de expresión de DRs, mutaciones no funcionales o la pérdida de señal apoptótica por la unión del ligando mortal a receptores señuelo) [244, 245] y la sobre-expresión de proteínas anti-apoptóticas (como cFLIP, proteínas de la familia Bcl-2 e IAPs) son algunos factores descritos en la literatura científica que contribuyen a la resistencia a Apo2L/TRAIL [203, 243, 246-250]. Así mismo, se ha descrito que la regulación de los DRs, así como la inhibición de proteínas anti-apoptóticas, son capaces de reconstituir la sensibilidad de las células a la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL [207-209, 244, 251-253].

El conocimiento de los principales mecanismos moleculares de resistencia al efecto anti-tumoral de Apo2L/TRAIL de las células tumorales, permitió el desarrollo y la implementación de mejoras en la eficacia de los tratamientos basados en Apo2L/TRAIL y abrió paso a la exploración de terapias combinadas con diferentes agentes sensibilizantes. De este modo, se inició una búsqueda de

moléculas que fueran capaces de ejercer un efecto sinérgico y sensibilizador a la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL en células tumorales.

Existen diversos ensayos pre-clínicos que describen procesos de sensibilización a la apoptosis mediante diferentes mecanismos, principalmente a través de la regulación de los niveles de expresión y localización de los receptores mortales, la regulación de los niveles de proteínas pro- y anti-apoptóticas y la regulación de la amplificación de la señalización apoptótica mitocondrial [158, 206, 254, 255]. De este modo, compuestos quimioterápicos clásicos como cisplatino [256], carboplatino [257], etopósido [258, 259], adriamicina [260] o doxorrubicina [261] han demostrado ser buenos agentes sensibilizantes a la actividad apoptótica de Apo2L/TRAIL. También, determinados inhibidores de la transcripción de proteínas, como son los inhibidores de quinasas dependientes de ciclina como flavopiridol [201, 207, 262] o SNS-032 [263], inhibidores del proteasoma como bortezomib [206] o inhibidores de histona deacetilasas (HDACi) [264-266], han sido destacados en diversos ensayos pre-clínicos como prometedores candidatos para el tratamiento combinado con Apo2L/TRAIL en pacientes con diferentes tipos de cáncer (Tabla 1.2).

Tabla 1.2 Agentes sensibilizantes a la apoptosis inducida por TRAIL y mecanismos de acción descritos en diferentes tipos celulares tumorales.

Agente terapéutico	Tipo de cáncer	Mecanismo	Ref.
Quimioterapia			
Doxorrubicina	Carcinoma ovárico	Incremento de DR5	[261]
Cisplatino	Glioblastoma	Incremento de DR5	[256]
Carboplatino	Mesotelioma pleural maligno	Incremento de DR4 y DR5	[257]
Etopósido	Glioma	Incremento de DR5	[258]
	Células tumorales epiteliales	Incremento de DR4 y DR5	[259]
Adriamicina	Carcinoma renal	Incremento de DR4 y DR5	[260]
Inhibidores moleculares			
Flavopiridol	Cáncer de mama	Disminución de cFLIP	[201]
	Cáncer de mama y pulmón	Disminución de cFLIP	[207]
	Cáncer de mama	Incremento de DR5	[309]
	Cáncer de pulmón de células no pequeñas	Disminución de cFLIP, Mcl-1, Bcl-XL y XIAP	[308]
SNS-032	Cáncer de pulmón de células no pequeñas	Disminución de cFLIP, Mcl-1, Bcl-XL y XIAP	[263,308]
Bortezomib	Mieloma	Disminución de cFLIP y Mcl-1	[206]
HDACi	Leucemia	Inducción de ROS	[264]
	Leucemia	Incremento de DR4	[265]
	Tumores sólidos	Incremento de DR5	[266]
	Leucemia	Incremento de TRAIL	[269]
Otros agentes			
Ácido retinoico	Leucemia	Incremento de TRAIL	[268]
Edelfosina	Cáncer gástrico	Incremento de DR5	[328]
ONC201	Tumores sólidos	Incremento de DR5, TRAIL y ER	[273-276]

Otro enfoque de terapia basado en Apo2L/TRAIL es la activación de la vía extrínseca de la apoptosis con agentes anti-tumorales que induzcan la expresión de Apo2L/TRAIL en las propias células. La expresión endógena de Apo2L/TRAIL puede regularse a través de mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales [267]. En este sentido, se han descrito diferentes compuestos moleculares, como el ácido retinoico [268] o HDACi [269] capaces de producir una expresión de TRAIL inducida, mecanismo responsable de la apoptosis y control anti-tumoral en células de leucemia. Así mismo, se ha demostrado que TNF- α [270], inhibidores de DNA metiltransferasa [271] y determinados HDACi [272] sensibilizan las células tumorales de cáncer de mama a la quimioterapia a través de la inducción de Apo2L/TRAIL. Sin embargo, dentro de esta estrategia terapéutica destaca el compuesto ONC201, una pequeña molécula perteneciente a un nuevo grupo de agentes anti-cancerígenos llamados imipridonas [273, 274].

ONC201 inactiva las quinasas Akt y ERK, produciendo la traslocación de Foxo3a al núcleo, donde se une al promotor de Apo2L/TRAIL induciendo una expresión continuada en células tumorales y normales de este ligando mortal [273-275]. Esta forma de regulación en la transcripción génica mejora las concentraciones de Apo2L/TRAIL en el microambiente tumoral, favoreciendo así el efecto supresor endógeno. Además, se ha descrito que este efecto anti-tumoral se ve potenciado en determinadas células a través de una regulación positiva simultánea del receptor mortal DR5 por parte de ONC201 [276]. Dado los prometedores resultados pre-clínicos, ONC201 fue aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*, EEUU) para iniciar ensayos clínicos en 2014 [277, 278]. Actualmente el compuesto ONC201 se encuentra en la fase II en 12 ensayos clínicos, evaluándose su eficacia como agente único en diversos tumores sólidos y neoplasias hematológicas [277].

1.3.1 Desarrollo de nuevas estrategias en la terapia basada en Apo2L/TRAIL

Existen diversas limitaciones en las terapias anti-tumorales basadas en Apo2L/TRAIL desarrolladas hasta la fecha, siendo las principales una vida media

corta [225, 227], una baja colocación de la proteína en la zona diana del tratamiento y una resistencia intrínseca a la monoterapia [279, 280]. El desarrollo de terapias combinadas con diferentes agentes sensibilizantes, como se ha descrito anteriormente, ha permitido solventar el problema de la resistencia, sin embargo, no ha sido suficiente para obtener una clara eficacia clínica. Es por ello que se requiere un abordaje más profundo en la estructura de la propia proteína y las formas de administración en búsqueda de poder solventar dichas limitaciones. La biotecnología y la nanotecnología son útiles herramientas que han permitido el desarrollo de nuevas formulaciones de la proteína y la implementación de nuevas estrategias de tratamiento con el objetivo de aumentar la estabilidad y direccionalidad de Apo2L/TRAIL.

1.3.1.1 Nuevas formulaciones de Apo2L/TRAIL

La bioactividad de Apo2L/TRAIL está estrechamente ligada con su correcta disposición y estabilidad estructural. Se ha descrito que para una eficiente agrupación de los receptores es necesaria una trimerización estable de los monómeros de Apo2L/TRAIL [64].

Las primeras formas recombinantes de la proteína disponían de una fracción asociada al extremo N-terminal del componente extracelular de Apo2L/TRAIL, pudiendo ser una cadena de aminoácidos denominado “tag” de poli-histidina (his-Apo2L/TRAIL) [109] o un epítipo FLAG (FLAG-Apo2L/TRAIL) [108] (Figura 1.20). Aunque la función inicial de estas estructuras era facilitar el proceso de purificación, cumplían también un papel facilitando la estabilización de la forma trimérica de Apo2L/TRAIL. Sin embargo, a pesar de demostrar eficacia anti-tumoral *in vitro* (en el caso de FLAG-Apo2L/TRAIL es necesario un *cross-linking* adicional a través de un anticuerpo específico M2, dirigido contra FLAG) [108] y seguridad *in vivo* en diferentes modelos animales [224, 281, 282], las pruebas con hepatocitos primarios humanos aislados (PHH, del inglés *Primary Human Hepatocytes*) mostraron citotoxicidad debido a la agrupación de la proteína en agregados supra-moleculares disfuncionales [283, 284]. Estos hallazgos evidencian una estrecha relación entre la adecuada agrupación

estructural y estabilidad de la molécula y la toxicidad hepática que presenta Apo2L/TRAIL en el organismo, determinándose así su seguridad como tratamiento anti-tumoral.

Una aportación a la mejora en la estabilidad trimérica de los monómeros de Apo2L/TRAIL fue la introducción de dominios específicos de trimerización en la estructura proteica. De este modo se desarrollaron proteínas recombinantes de Apo2L/TRAIL con cremalleras de leucina (LZ-Apo2L/TRAIL) [224] e isoleucina (iz-Apo2L/TRAIL) [283]. Otra estrategia desarrollada en búsqueda de moléculas de Apo2L/TRAIL triméricas altamente estables, fue la generación de la proteína trimérica activa codificada por una secuencia de cadena única, estructuras conocidas como proteínas *single-chain*. De este modo se generó scApo2L/TRAIL, cuya secuencia codificante de DNA está formada por los tres monómeros constitutivos de la fracción extracelular de la proteína conectados entre sí por pequeños polipéptidos de unión denominados *linker* [285]. Esta forma trimérica de Apo2L/TRAIL presenta un alto grado de estabilidad molecular, donde está asegurada una correcta asociación estructural de los tres monómeros al eliminarse las interacciones inespecíficas. Tanto las proteínas LZ-Apo2L/TRAIL y iz-Apo2L/TRAIL como sc-Apo2L/TRAIL (Figura 1.20), mostraron mayor actividad citotóxica *in vitro* e *in vivo*, así como mejoras en otros parámetros como la vida media de la proteína tras la administración sistémica, en comparación con la proteína recombinante Dulanermin®, mostrándose además un tratamiento seguro en modelos animales y con ausencia de citotoxicidad en PHH [224, 286].

Además de la estabilidad molecular, otro objetivo a cumplir en la búsqueda de nuevos constructos de Apo2L/TRAIL que mejoren los resultados clínicos de los tratamientos actuales, es la direccionalidad de la proteína hacia las dianas de tratamiento, en este caso las células tumorales. La localización del tratamiento en la zona adecuada permite optimizar las concentraciones administradas, reduciéndose los efectos secundarios y la posible toxicidad sistémica. Para ello, la técnica avanzada de las proteínas de fusión constituye una útil herramienta para dirigir la proteína Apo2L/TRAIL hacia el microambiente tumoral o directamente hacia las propias células tumorales. La técnica consiste en fusionar a la proteína

Apo2L/TRAIL determinados dominios específicos de reconocimiento de las células diana, sin que ello afecte a su bioactividad. En este sentido, se han desarrollado en los últimos años una amplia variedad de proteínas de fusión basadas en Apo2L/TRAIL, siendo los fragmentos scFv los dominios específicos de reconocimiento más ampliamente utilizados [287, 288]. Los fragmentos variables de cadena única (scFv, del inglés, *single-chain variable Fragment*) son dominios que corresponden a la región variable de las inmunoglobulinas, caracterizados por su pequeño tamaño y por la propiedad de mantener el reconocimiento antígeno-específico, propio de los anticuerpos. Las proteínas CD3 [287], CD7 [287], CD19 [289], CD20 [290], CD33 [291], CD40 [292], EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) [293] o CEA (*Carcinoembryonic Antigen*) son algunos antígenos tumorales, caracterizados por su sobre-expresión en la superficie celular en ciertos tipos de tumores, en los que se han basado el desarrollo de las principales proteínas de fusión scFv:Apo2L/TRAIL (Figura 1.20).

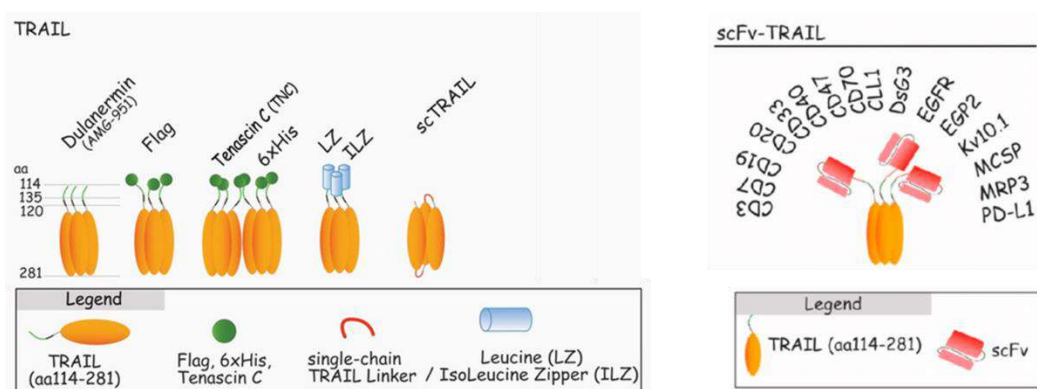


Figura 1.20 Representación esquemática de las principales proteínas recombinantes de Apo2L/TRAIL. Dulanermin® (AMG-951), FLAG-Apo2L/TRAIL (Flag), his-Apo2L/TRAIL (6xHis), LZ-Apo2L/TRAIL (LZ), iz-Apo2L/TRAIL (ILZ), sc-Apo2L/TRAIL (scTRAIL) y scFv-Apo2L/TRAIL. Modificado de “*Antibodies and derivatives targeting DR4 and DR5 for cancer therapy*”, Dubuisson, A. et al. (2017).

1.3.1.2 Nanopartículas en el tratamiento con Apo2L/TRAIL

La nanobiotecnología ha abierto una puerta al desarrollo de nanoterapias basadas en Apo2L/TRAIL. El empleo de diferentes tipos de nanopartículas con

Apo2L/TRAIL puede mejorar distintos aspectos de este ligando mortal respecto a su forma soluble: i) permite potenciar la estabilidad del ligando mortal, de tal modo que se prolongue su vida media en el plasma; ii) permite incrementar su potencial anti-tumoral; iii) permite gracias a la propiedad característica de las nanopartículas conocida como efecto EPR (*Enhanced Permeability and Retention Effect*), proporcionar una cierta direccionalidad del tratamiento hacia la localización del tumor [294-296]; iv) permite gracias al acoplamiento adicional a dichas nanopartículas de diferentes moléculas dirigir específicamente las nanopartículas contra las células cancerosas. Todas estas ventajas presentes en el uso de nanopartículas, tanto para el tratamiento con la proteína recombinante Apo2L/TRAIL como para las terapias génicas, permiten superar la resistencia a la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL en muchas células tumorales [297].

La variedad de nanopartículas desarrolladas para las terapias basadas en Apo2L/TRAIL es muy amplio, entre las que se incluyen: liposomas, nanopartículas de albúmina, nanopartículas poliméricas, nanovectores inorgánicos y nanoestructuras de DNA [297]. Sin embargo, dadas sus propiedades físicas y químicas, entre todos ellos destacan los liposomas. Los liposomas son estructuras esféricas constituidas por bicapas lipídicas de forma semejante a las membranas celulares, lo que le otorga una excelente biocompatibilidad. Además otras propiedades como la habilidad de encapsular compuestos (hidrofílicos e hidrofóbicos) y la posibilidad de una funcionalización en la superficie con moléculas de reconocimiento de dianas específicas, ha determinado que los liposomas se consideren desde hace décadas óptimos vectores para la administración de tratamientos, siendo aprobados por la FDA para numerosas aplicaciones [298, 299].

1.3.1.2.1 Nanopartículas con la proteína Apo2L/TRAIL en monoterapia

Existen dos estrategias principales para la administración en nanopartículas de la proteína recombinante Apo2L/TRAIL: localizar la proteína en el interior de la nanopartícula o asociarla a su superficie.

La administración de Apo2L/TRAIL en el interior del lumen de una nanopartícula es una buena herramienta para asegurar un suministro constante y estable al microambiente tumoral [300-302]. Además, en el caso de las partículas liposomales, el medio acuoso del lumen mantiene la estructura nativa de la proteína tras el proceso de encapsulación, esencial para el mantenimiento de su bioactividad.

Por otra parte, la unión de Apo2L/TRAIL a la superficie de nanopartículas, asemejando la forma fisiológica transmembrana de la proteína, ha demostrado presentar mayor actividad anti-tumoral que la proteína recombinante soluble [64, 141, 303-310]. Como se ha explicado anteriormente, una eficiente señalización apoptótica requiere una agregación y oligomerización de los receptores mortales en estructuras supramoleculares, que sólo se consigue con la forma transmembrana del ligando. Esta agregación de receptores resulta en un reclutamiento mejorado del DISC que potencia la activación de la cascada de señalización y ejecuta eficientemente la apoptosis con respecto a la forma soluble del ligando, la cual requerirá una amplificación de la señal a través de la ruta mitocondrial para inducir una muerte celular significativa (Figura 1.21). Además, la activación de la apoptosis a través de DR5, el receptor que más contribuye a la muerte celular, requiere un elevado grado de entrecruzamiento del ligando, que se alcanza con la asociación de Apo2L/TRAIL a una superficie de membrana.

En las nanopartículas conjugadas con Apo2L/TRAIL en la superficie, es importante que la unión mediante enlace covalente o no covalente no altere la afinidad al receptor agonista. En este sentido, nuestro grupo fue el primero en generar liposomas de tipo LUV (del inglés, *Large Unilamellar Vesicles*) con Apo2L/TRAIL inmovilizado en la superficie, que inicialmente fueron ensayado en un modelo animal de artritis reumatoide [311], pero que han demostrado ejercer alto grado de citotoxicidad en diferentes tipos de tumores [141, 303, 307-310].

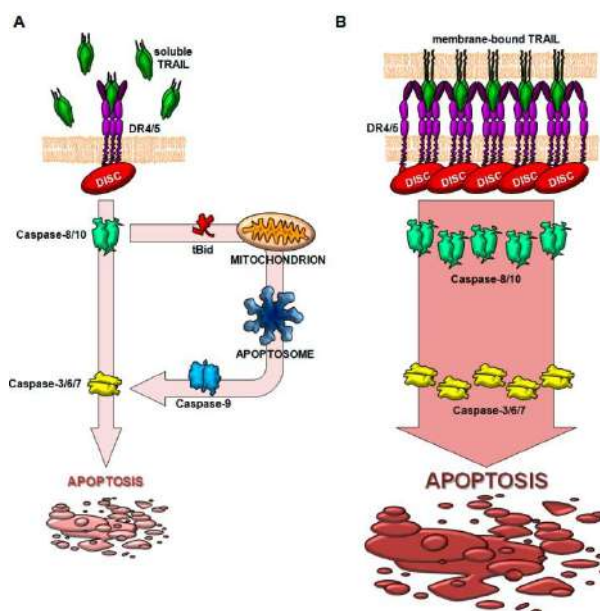


Figura 1.21 Modelo de la inducción de la señal apoptótica inducida por Apo2L/TRAIL en forma soluble (A) y como proteína transmembrana (B). *"Importance of TRAIL molecular anatomy in receptor oligomerization and signaling. Implications for cancer therapy"*, Naval, J. et al. (2019).

1.3.1.2.2 Nanopartículas con la proteína Apo2L/TRAIL en terapia combinada

Como se ha mencionado anteriormente, los tratamientos combinados de Apo2L/TRAIL con agentes sensibilizantes son un recurso necesario para superar la resistencia a las monoterapias basadas en el ligando mortal. La encapsulación de fármacos en nanopartículas permite un nuevo sistema de transporte alternativo que elimina algunas de las principales limitaciones de la administración de los mismos en su forma libre, como es el ineficiente transporte sistémico y la retención en tejidos no deseados, generando efectos secundarios debido a la toxicidad.

Las nanopartículas más utilizadas para la vectorización de fármacos son los liposomas [312-314], ya que sus propiedades estructurales, especialmente su tamaño y composición, le otorgan mejores características para la encapsulación y transporte de fármacos frente a otras nanopartículas desarrolladas para el mismo fin, como son las micelas poliméricas [315] o las nanopartículas conjugadas [316]. La configuración esférica de las membranas lipídicas con fosfolípidos en la

composición, conformando un núcleo acuoso, proporciona un alto grado de biocompatibilidad celular y una versatilidad en la encapsulación de una gran variedad de moléculas, localizándose los compuestos hidrofílicos en el interior y los hidrofóbicos en la región de la membrana [317, 318]. Además, el tamaño de los liposomas determina una cierta direccionalidad pasiva debido al efecto EPR [314].

El primer compuesto conjugado en una estructura liposomal administrado en clínica fue la doxorubicina, bajo el nombre comercial de Doxil® [319], aunque previamente formulaciones liposomales con otros compuestos como la anfotericina B o la cistosina arabinosa fueron generadas y estudiadas en ensayos pre-clínicos como candidatos a posibles agentes liposomales terapéuticos [314, 320].

Aunque los liposomas presenten óptimas características para el transporte de fármacos debido a sus propiedades intrínsecas, éstas pueden mejorarse a través de la funcionalización de la superficie de los mismos [321]. Se ha descrito que la incorporación de PEG (Polietilenglicol) a la estructura lipídica mejora el perfil farmacodinámico y aumenta la vida media en plasma. También se ha demostrado que la asociación de dominios específicos de reconocimiento a la superficie como scFv, aunque no mejoran la direccionalidad de forma activa, sí favorecen la incorporación del compuesto a la célula a través de procesos de endocitosis [322]. Estos liposomas funcionalizados con anticuerpos para dirigirse específicamente hacia las células diana reciben el nombre de inmuno-liposomas [323, 324].

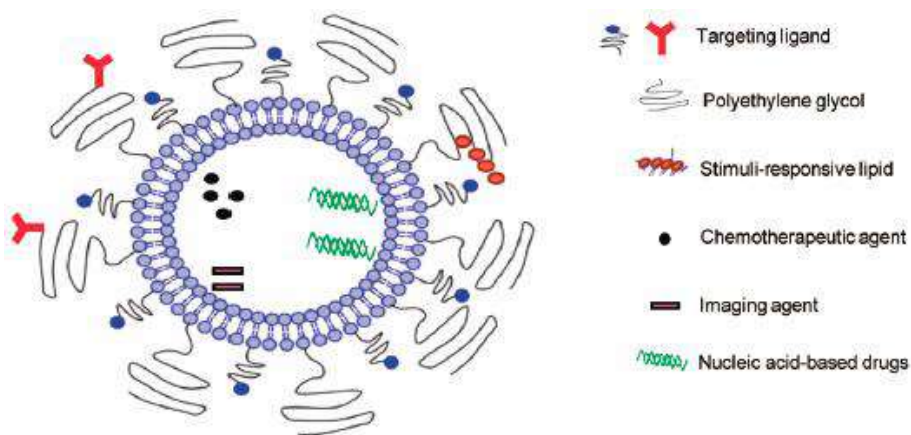


Figura 1.22 Representación esquemática de la funcionalización de los liposomas. “*Liposomal delivery systems: design optimization and current applications*”, Abu Lila, A. et al. (2017).

Finalmente, se ha descrito la existencia de un efecto directo de los liposomas sobre la composición lipídica de la membrana celular. Los liposomas son capaces de transmitir lípidos de su composición a la membrana plasmática celular, llegando a modificar las propiedades de la misma [325]. Los cambios producidos a nivel de la membrana sensibilizan a las células a fármacos como vinblastina [326] o doxorrubicina [327], encapsulados en el interior del liposoma. Este hallazgo abre una nueva estrategia de terapia, donde los liposomas no sólo cumplen la función de vectorizar el compuesto, sino que además su composición lipídica se puede utilizar como mecanismo de sinergia para potenciar el efecto anti-tumoral del tratamiento, por ejemplo a través de la incorporando lípidos sensibilizantes a la inducción de Apo2L/TRAIL como la edelfosina [328].

En base a ello, la encapsulación de fármacos en el interior de nanopartículas además de la incorporación de Apo2L/TRAIL a nanoestructuras, son estrategias que pueden combinarse para desarrollar tratamientos anti-tumorales más eficaces. La co-administración de Apo2L/TRAIL y agentes sensibilizantes (como doxorrubicina o paclitaxel), tanto en la misma micro-estructura como en nanopartículas independientes, produce una sinergia que potencia el efecto anti-tumoral de Apo2L/TRAIL, induciendo apoptosis en células altamente resistentes [297, 329-331]. Estos hallazgos asientan la base hacia un

nuevo abordaje y posible desarrollo de terapias anti-tumorales combinadas más efectivas basadas en Apo2L/TRAIL.

1.4 Sarcomas

1.4.1 Generalidades

Los sarcomas son un grupo muy heterogéneo de tumores derivados de células transformadas de origen mesenquimático. Aunque es una patología poco frecuente, se estima que representa el 1% de todos los tumores malignos, con una alta incidencia en la población infantil y juvenil, constituyendo aproximadamente el 15% de todas las neoplasias infantiles. Además, se caracterizan por ser altamente agresivos, siendo los responsables del 2% de las muertes producidas por cáncer [332].

Los sarcomas constituyen una amplia variedad de tumores que afectan a múltiples tejidos, clasificándose en dos grandes categorías: sarcomas de partes blandas y sarcomas óseos. Los sarcomas de partes blandas, también conocidos como STS (del inglés, *Soft Tissue Sarcoma*) están formados por más de 50 subtipos histológicos diferentes, siendo el liposarcoma, leiomasarcoma y sarcoma pleomórfico indiferenciado los más comunes en adultos, mientras que el rabdomiosarcoma es el que más incidencia presenta en edad pediátrica [333]. Los sarcomas óseos están constituidos en mayor medida por el sarcoma de Ewing, osteosarcoma y condrosarcoma, siendo el sarcoma de Ewing el más maligno cuyo origen es una traslocación genética específica, siendo la más frecuente la traslocación t(11;22) (q24;q22).

Por lo general, los sarcomas son tumores altamente agresivos, aunque el pronóstico depende de factores como la presencia de metástasis, el grado, el tamaño o la profundidad del tumor [334, 335]. Entre toda la variedad de sarcomas, el rabdomiosarcoma, el sarcoma sinovial, el sarcoma de Ewing y el osteosarcoma destacan por ser tumores malignos de grado alto, con elevado potencial metastásico [333, 335]. Aunque la tasa de supervivencia en el caso de tumor localizado supera generalmente el 70%, la supervivencia se estima en poco más

de 12 meses en pacientes con sarcoma metastásico en el momento del diagnóstico [336, 337]. Esta presencia de metástasis en el momento de diagnóstico afecta a un número considerable de pacientes, representando más del 10% de todos los pacientes diagnosticados con osteosarcoma [338].

1.4.2 Tratamiento

La gran heterogeneidad presente en los sarcomas determina que los tratamientos sean complejos y deban presentar un enfoque multidisciplinar, siendo la cirugía el abordaje principal en todos los casos. De forma complementaria, la radioterapia favorece el control tumoral a nivel local [339, 340], mientras que la función de la quimioterapia en el tratamiento de los sarcomas sigue siendo controvertida a día de hoy. Aunque los sarcomas de Ewing particularmente presentan elevado grado de sensibilidad a la quimioterapia clásica [340], la gran heterogeneidad del extenso grupo de tumores que constituyen los sarcomas no permite proporcionar un conocimiento exacto de la sensibilidad y la respuesta tumoral a los tratamientos quimioterápicos, principalmente en STS. A pesar de ello, la doxorrubicina se mostró como un fármaco eficaz para el tratamiento de STS en 1970, siendo a día de hoy la primera línea de tratamiento quimioterápico para tumores en estadio avanzado, con una tasa de respuesta como agente único de aproximadamente 14%, que asciende al 26% si se combina con ifosfamida para el tratamiento de STS metastásicos [341]. Por otro lado, ensayos clínicos recientes demostraron que la trabectedina es efectiva especialmente para el tratamiento de leiomiomasarcoma y liposarcoma, aprobándose en Europa como tratamiento para pacientes con estos tipos de sarcoma con resistencia a la quimioterapia con doxorrubicina e ifosfamida [342-345].

En los últimos años se han desarrollado nuevas terapias moleculares dirigidas contra dianas específicas de las células transformadas, que se encargan de inhibir y bloquear determinados procesos celulares, demostrando una actividad anti-tumoral. Entre los compuestos más prometedores destacan los inhibidores de tirosina quinasas pazopanib [343, 346], imatinib [347] y sunitinib [348].

1.4.3 Apo2L/TRAIL en sarcomas

Se ha estudiado el potencial de Apo2L/TRAIL como posible tratamiento de los sarcomas, sin embargo, no son muchos los estudios realizados en este sentido y en su mayoría forman parte del ámbito pre-clínico. Aunque la mayoría de los estudios se han centrado en el empleo de las terapias basadas en Apo2L/TRAIL con las moléculas utilizadas en los ensayos clínicos, fundamentalmente la forma soluble de Apo2L/TRAIL [349], se ha descrito que las formulaciones optimizadas del ligando, como las proteínas de fusión, presentan mayor potencial anti-tumoral, siendo especialmente sensibles al tratamiento las células de sarcoma de Ewing [350]. Resulta interesante que en varios de los trabajos en los que se ha explorado el potencial anti-tumoral de Apo2L/TRAIL en sarcomas, este ligando mortal se ha empleado en combinación con otros fármacos [351-357], donde los compuestos quimioterápicos tradicionales como doxorubicina, cisplatino y etopósido indujeron una mayor sensibilización a la muerte inducida por Apo2L/TRAIL [350], indicando que estos sarcomas son parcialmente resistentes a la forma soluble del ligando mortal [358]. Sin embargo, a pesar de los pocos datos del uso terapéutico de Apo2L/TRAIL en sarcomas, existen datos en pacientes tratados con formulaciones basadas en Apo2L/TRAIL que apuntan a que éste puede ser efectivo como tratamiento frente a determinados sarcomas (Tabla 1.3) [225, 358-363].

Tabla 1.3 Principales estudios clínicos basados en TRAIL para el tratamiento de sarcomas.

Tratamiento	Tipo de estudio	Tipo de cáncer	Ref
Conatumumab (Agonista DR5; AMG655)	Ensayo clínico Fase Ib/II (NCT00819169)	Tumores sólidos refractarios, localmente avanzados o metastásicos (incluidos casos de sarcoma)	[361]
Conatumumab (Agonista DR5; AMG655)	Ensayo clínico Fase Ib/II (NCT00626704)	STS no rescatables, localmente avanzados o metastásicos	[362]
Lexatumumab (Agonista DR5; HGS-ETR2)	Ensayo clínico Fase I (NCT00428272)	Sarcoma de Ewing, osteosarcoma, neuroblastoma y rabdomiosarcoma	[363]
Dulanermin (rhTRAIL; AMG951)	Caso de estudio	Condrosarcoma refractario	[358]
TRAIL humano recombinante (rhTRAIL)	Ensayo clínico Fase I	Cáncer avanzado (incluidos casos de sarcoma)	[225]
PRO95780 (Agonista DR5; Drozitumab)	Ensayo clínico Fase I	Cáncer avanzado (incluidos casos de sarcoma)	[359]
PRO95780 (Agonista DR5; Drozitumab)	Ensayo clínico Fase II (NCT00543712)	Condrosarcoma avanzado	-

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

2 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

2.1 Antecedentes

Hasta la fecha, los datos obtenidos por nuestro grupo han demostrado que TRAIL anclado a la superficie de liposomas artificiales, denominados LUV-TRAIL, son más eficaces que la forma soluble de TRAIL (sTRAIL) a la hora de inducir apoptosis en tumores de distinto origen, tanto en neoplasias hematológicas como en tumores sólidos (pulmón, mama y colon). Estos hallazgos asientan la base para un nuevo enfoque experimental donde el uso de las nanopartículas lipídicas recubiertas con TRAIL pueden emplearse para mejorar la bioactividad de este ligando mortal, lo que podría significar un importante avance en las terapias anti-tumorales contra el cáncer.

Sin embargo, aunque la capacidad citotóxica de LUV-TRAIL sigue siendo mayor que la de sTRAIL, en algunos de los cánceres estudiados el efecto anti-tumoral no ha mostrado ser muy elevado. Por ello, resulta imprescindible mejorar la capacidad citotóxica de LUV-TRAIL para conseguir aumentar su bioactividad con vistas a una posible aplicación terapéutica, sobre todo en aquellos tumores que son resistentes a la acción citotóxica de TRAIL.

Por ello, nuestra hipótesis es que empleando distintas aproximaciones experimentales se pueden optimizar los LUV-TRAIL, incrementando su bioactividad mediante diferentes enfoques. De esta forma, se busca generar unos LUV-TRAIL funcionalizados con la mayor capacidad citotóxica posible frente a células tumorales.

El modelo experimental tumoral elegido para corroborar esta hipótesis, es el sarcoma. Existen indicios de la eficacia de terapias basadas en TRAIL en casos aislados de sarcoma, sin embargo, a día de hoy no se ha desarrollado una amplia investigación del efecto anti-tumoral de TRAIL en este grupo de tumores. Teniendo en cuenta la mayor eficacia anti-tumoral demostrada de LUV-TRAIL en comparación con sTRAIL y la necesidad de nuevos tratamientos en el manejo terapéutico de los sarcomas, este tipo de cáncer supone un modelo idóneo para

explorar la optimización de LUV-TRAIL y su potencial como tratamiento anti-tumoral en este tipo de tumores.

2.2 Objetivos

A la vista de todo lo anterior, el objetivo principal de esta tesis ha sido la generación de nuevas formulaciones optimizadas de TRAIL basadas en el empleo de nanopartículas lipídicas y validar su uso pre-clínico como nuevo tratamiento anti-tumoral como paso previo a una posible aplicación clínica.

Para lograr el objetivo principal, se plantearon unos objetivos específicos que se exponen a continuación:

1. Analizar la bioactividad de LUV-TRAIL en sarcomas y caracterizar el tipo y mecanismo de muerte celular activado.
2. Optimizar LUV-TRAIL para mejorar su bioactividad. Esta optimización se realizará empleando distintos abordajes experimentales:
 - A) Empleando LUV-TRAIL en combinación con distintas drogas para sensibilizar a las células tumorales a la muerte inducida por LUV-TRAIL.
 - B) Modificando la composición lipídica de LUV-TRAIL variando el porcentaje de los lípidos actualmente usados o introduciendo nuevos lípidos con actividad anti-tumoral.
 - C) Encapsular en el interior de LUV-TRAIL distintas drogas para sensibilizar a las células tumorales a la muerte inducida por LUV-TRAIL.
3. Analizar la bioactividad y los mecanismos de acción subyacentes en la muerte celular inducida por las variantes optimizadas de LUV-TRAIL generadas en comparación con los LUV-TRAIL *clásicos* en distintos escenarios:
 - A) En diversas líneas celulares tumorales provenientes de sarcoma con distinta sensibilidad a TRAIL.

- B) En células tumorales provenientes de tumores aislados a partir de pacientes afectados de sarcoma.
- C) En modelos animales de ratones inmunodeficientes usando xenotransplantes de tumores humanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Reactivos y compuestos químicos

Compuesto	Casa comercial	Concentración de uso
z-VAD-fmk	Bachem	30 μ M
z-IETD-fmk	BD Biosciences	30 μ M
Necrostatina 1	Sigma	30 μ M
Dynasore [®]	Selleckchem	80 μ M
Doxorrubicina	Selleckchem	1-2,5 μ M
Flavopiridol HCl	Selleckchem	50-200 nM
SNS-032	Selleckchem	200-600 nM
Trabectedina	PharmaMar	4-16 ng/ml
Bortezomib/ Velcade [™]	Millenium Pharm.	5-80 nM
Ácido Valproico	Selleckchem	1-10 mM
FK228	Selleckchem	5-100 μ M
<i>Hoechst</i> 33342	Life Technologies	1-20 μ g/ml
Proteína A/G PLUS-agarosa	Santa Cruz Biotech.	
Resina de cobalto IMAC HisPur [™]	Thermo Scientific	
7-AAD	Inmunostep	
Anexina-V FITC/DY634	Inmunostep	
Mitomicina C	Sigma	80 ng/ml

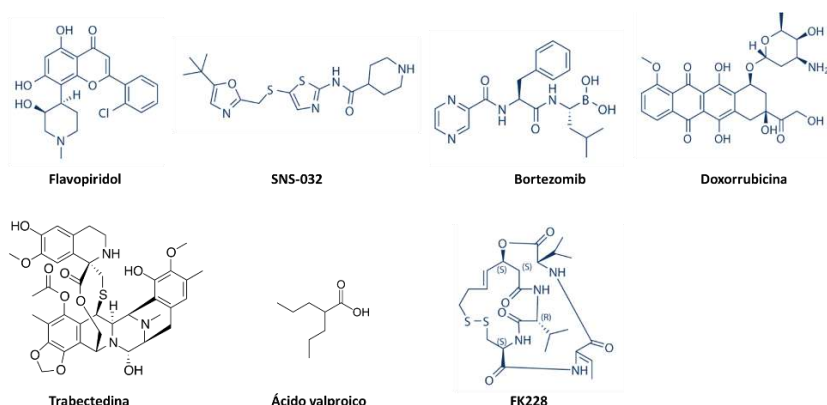


Figura 3.1 Estructura molecular de los principales compuestos utilizados como agentes sensibilizantes. Modificado de Selleckchem.com

3.1.2 Proteínas

sTRAIL-His₆ Proteína recombinante producida en el laboratorio a partir del plásmido cedido amablemente por la Dra. *Marion Macfarlane*

3.1.3 Anticuerpos

Antígeno	Especie	Casa comercial	Aplicación	Dilución	Conj.
Apo2L/TRAIL	Ratón (MC)	eBioscience	BLOQ	500 ng/ml	
Bcl-X _L	Conejo (PC)	Cell Signaling	WB	1/1000	
Bid	Cabra (PC)	R&D Systems	WB	1/1000	
Calreticulina	Ratón (MC)	Enzo	CF	1/1000	DyLight™ 488
Caspasa-3	Cabra (PC)	R&D Systems	WB	1/1000	
Caspasa-8	Ratón (MC)	BD Pharmingen	WB	1/1000	
cFLIP	Ratón (MC)	Adipogem	WB	1/250	
IgG	Hámster	eBioscience	CF		FITC
IgG1	Ratón (MC)	ThermoFisher	CF	1/100	DyLight™ 488
IgG1 k	Ratón (MC)	ThermoFisher	CF		PE
Mcl-1	Conejo (PC)	Santa Cruz Biotech.	WB	1/1000	
PARP-1	Ratón (MC)	Enzo	WB	1/1000	
TRAIL-R1/DR4	Ratón (MC)	eBioscience	CF		PE
TRAIL-R2/DR5	Ratón (MC)	eBioscience	CF		PE
TRAIL-R3/DcR1	Ratón (MC)	eBioscience	CF		PE
TRAIL-R4/DcR2	Ratón (MC)	Thermo	CF		PE
XIAP	Ratón (MC)	BD Transduction	WB	1/500	
β-actina	Ratón (MC)	Sigma	WB	1/10000	

Abreviaturas: MC: Monoclonal; PC: Policlonal; WB: Western blot; CF: Citometría de flujo; BLOQ: Bloqueante.

3.1.4 Tampones

Nombre	Composición/ Casa comercial	pH
Tampón de trituración	CaCl ₂ 0,1 M, MgCl ₂ 0,07 M y acetato de sodio 0,04 M	
Tampón de conservación	CaCl ₂ 0,1 M y 15% de glicerol	
TBE	Gibco	
TAE	Gibco	
<i>Lisis Buffer</i> de sonicación	NaCl 300 mM, Na ₂ HPO ₄ 50 mM, imidazol 20 mM, 10% glicerol y 0,5% Triton X-100	8
<i>Wash Buffer</i>	NaCl 300 mM, Tris/HCl 50 mM e imidazol 20 mM	8
<i>Elution Buffer</i>	NaCl 300 mM, Tris/HCl 50 mM e imidazol 250 mM	8
Tampón de lisis	0,1% Triton x100, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Na ₃ VO ₄ 1 mM, Na ₄ P ₂ O ₇ 1 mM, Leupeptina 10 µg/ml, NaF 10 mM, PMSF 1 mM, Tris/HCl 50 mM, 10% glicerol y 1 pastilla inhibidor de proteasas	7,6
Tampón de carga	Tris/HCl 150 mM, 3% SDS, Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O 0,3 mM, Na ₄ PO ₇ 30 mM, NaF 30 mM, 30% glicerol, 30% β-mercaptoetanol y 0,06% azul bromofenol	
Tampón de carrera	Tris 25 mM, glicina 180 mM y 0,1% SDS	
<i>Stacking Buffer</i>	Tris 1 M	6,8
<i>Resolving Buffer</i>	Tris 1,5 M	8,8
Tampón de transferencia	Tris/HCl 48 mM, glicina 39 mM y 0,037% SDS	8,3
Tinción <i>Coomassie</i>	Brillant Blue 0,5 g/l , 45% metanol y 6% ácido acético	
Decolorante	25% metanol, 10% ácido acético y 4% glicerina	
Tampón B	Timerosal 1 g/l y Tween 50 ml/l	
<i>Antibody Buffer Solution</i>	5% BSA, 0,05% acida de sodio, timerosal 1 g/l y Tween 50 ml/l	
ABB	NaCl 140 mM, CaCl ₂ 2,5 mM y HEPES/NaOH 10 mM	7,4

3.1.5 Lípidos

Nombre	Abrev.	Nomenclatura (origen)
Fosfatidilcolina	PC	L-α-fosfatidilcolina (huevo, pollo)
Esfingomielina	SM	N-(octadecanoil)-esfingo-4-enino-1-fosfocolina (cerebro, porcino)
Colesterol	CHOL	Colesterol (lana ovina, >98%)
DOGS-NTA-Ni		1,2-dioleoil-sn-glicero-3-[(N-(5-amino-1-carboxipentil) ácido iminodiacético) succinil] (sal de níquel)
Polietilenglicol	PEG	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilen glicol)-2000] (sal de amonio)
Edelfosina	EDF	1-O-octadecil-2-O-metil-sn-glicero-3-fosfocolina

Todos los lípidos (Avanti Polar Lipids) fueron solicitados en el formato comercial polvo y fueron resuspendidos en una mezcla de Cloroformo/Metanol (2/1) para su posterior almacenaje a -20°C.

3.1.6 Medios de cultivo, suplementos de cultivo y material para cultivo

Los medios de cultivo y suplementos se describen en la siguiente tabla:

Compuesto	Casa comercial	Condiciones de uso/Composición
Procariota - Cultivo bacteriano		
Ampicilina	Sigma	Usado a 100 µg/ml
IPTG	Sigma	Usado a 1M
Kanamicina	Sigma	Usado a 50 µg/ml
LB-agar	Sigma	Disuelto a 17,5 g/l (en H ₂ O _d)
LB	Sigma	Compuesto por peptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 0,5% (en H ₂ O _d)
Eucariotas - Cultivo celular		
DMEM	GIBCO	Usado al 10%
Glutamax™	GIBCO	
Penicilina/estreptomicina	Pan-Biotech	
RPMI 1640	GIBCO	
Suero fetal bovino	Sigma	
Tripsina/EDTA	Pan-Biotech	

Abreviaturas: DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

El material fungible utilizado para los cultivos celulares se describe en la siguiente tabla:

	Tamaño	Casa comercial
Pipetas	5, 10 y 25 ml	Costar
Puntas de micropipeta	0,1-10, 2-200 y 100-1000 µl	Daslab
Frascos de cultivo	25, 75 y 150 cm ²	TPP
Placas	6, 12, 24, 48 y 96 pocillos	TPP
Placas Petri	60 y 147,8 cm ²	TPP
Tubos de fondo cónico	15 y 50 ml	Corning
Criotubos	1,8 ml	Thermo Scientific
Microtubos	0,2, 0,6 y 1,5 ml	Deltalab

3.1.7 Cepas bacterianas

***E.Coli* DH5α**

Bacterias utilizadas para clonaje

***E.Coli* BL21-CodonPLUS**

Bacterias utilizadas para sobreexpresión y purificación de proteínas

3.1.8 Líneas celulares

Nombre	Especie	Tipología	Medio de cultivo	Sup. SFB	Origen
A673	Humana	Mesenquimal - Sarcoma de Ewing	DMEM	10%	ATCC
CADO-ES	Humana	Mesenquimal - Sarcoma de Ewing	DMEM	10%	ATCC
HT1080	Humana	Mesenquimal - Fibrosarcoma	DMEM	10%	ATCC
RD	Humana	Mesenquimal - Rabdomiosarcoma	DMEM	10%	ATCC
RH4	Humana	Mesenquimal - Rabdomiosarcoma	DMEM	10%	ATCC

Abreviaturas: **Sup. SFB:** Suplementación de suero fetal bovino; **DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*;

ATCC: *American Type Culture Collection*

3.1.9 Instrumentos

Aparato	Modelo y marca
Agitador	Shaker DOS-20L (ELMI)
Agitador de placas	Agitateur microtitration 94327 (Bioblock Scientific)
Autoclave	Autester Mod 4376 (Selecta)
Baño de agua	GFL
Cabina de flujo laminar	PV-100 (TELSTAR)
Cámara digital	DXM 1200 F (Nikon)
Centrífuga	5417 R Centrifuge (Eppendorf) Allegra® X-15R (Beckman Coulter) Avanti J-26 XP (Beckman Coulter) L8-60M Ultracentrifuge (Beckman Coulter)
Citómetro de flujo	FACSCalibur (BD)
Espectrofotómetro	Uvikon 922 (Kontron Instruments)
Evaporador de vacío	Concentrator plus (Eppendorf)
Extruder	Lipex™ (Northern Lipids)
Incubador celular	Hera-Cell 150 (Heraeus)
Incubador orbital	Excella E25 (New Brunswick Scientific)
Lector de placas	Multiskan EX (Thermo Scientific)
Microscopios	Eclipse 50i (Nikon) Eclipse Ts2 (Nikon) Eclipse TE300 (Nikon) Confocal LSM 880 (ZEISS)
Nano-espectrofotómetro	NanoVue (GE Healthcare)
pH-metro	pH Meter BASIC 20 (Crison)
Revelador	Amersham Image 600 (GE Healthcare)
Sistema de electroforesis	Xcell SureLock™ (Invitrogen) MiniVE (Amersham)
Sonicador	UP200S (Dr.Hielscher GmbH)
Termobloque	ThermoMixer comfort (Eppendorf)
Termociclador para PCR	2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)
Transferencia	TransBlot SD, Semidry transfer cell (BioRad)
Transiluminador	GelDoc 2000 (BioRad)

3.2 Métodos

3.2.1 Técnicas de biología molecular

3.2.1.1 Preparación de medios de cultivo bacterianos

Todas las manipulaciones, tanto de los medios como de los cultivos bacterianos, se realizaron con material estéril previamente autoclavado y dentro del área estéril creada por la llama de un mechero *Bunsen*.

El medio Luria-Bertani (LB) se preparó disolviendo en 1 l de agua destilada los siguientes compuestos: 10 g de triptona (PanReac, AppliChem), 5 g de extracto de levaduras (PanReac, AppliChem) y 5 g de NaCl (PanReac, AppliChem). La disolución se vertió en botellas de vidrio de un volumen de 500 ml y se esterilizaron en autoclave. Una vez atemperado, el medio LB se almacenó a 4 °C hasta su posterior uso.

Para preparar placas de LB-agar se pesaron 17,5 g de *Plate Count Agar* (Sigma) y se disolvieron en 1 l de agua destilada. La disolución se transfirió a botellas de vidrio y se esterilizó mediante autoclave. Una vez que la disolución estuvo atemperada, el antibiótico de selección fue añadido a la concentración correspondiente. La mezcla se vertió sobre placas Petri (50 ml/placa) y se dejó solidificar con la tapa semi-abierta durante aproximadamente 2 horas en la campana de flujo. Las placas se sellaron con película termoplástica (Parafilm) y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

3.2.1.2 Obtención de bacterias competentes

Las bacterias competentes se prepararon a partir de un cultivo inicial de *E.coli* DH5 α o *E.Coli* BL21-CodonPLUS (aproximadamente 10 ml). A este cultivo se le añadió 100 ml de medio LB estéril y se incubó en un agitador orbital a 37 °C hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial ($A_{600nm}=0,4$). Una vez enfriado en hielo durante 30 minutos, el volumen de bacterias fue repartido en tubos de centrifuga estériles que se centrifugaron a 1500 g y 4 °C durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y el *pellet* fue resuspendido en tampón de trituración

que permite la formación de poros en la membrana bacteriana. Tras reposar en hielo durante 15 minutos, las bacterias se centrifugaron a 3500 g a 4 °C durante 10 minutos y el *pellet* fue resuspendido en el tampón de conservación. El volumen final (4 ml aproximadamente) se repartió en alícuotas de 400 µl, que se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su utilización.

3.2.1.3 Transformación de bacterias

El proceso llevado a cabo para la transformación de bacterias fue el de transformación por choque térmico. Las bacterias (*E.coli* DH5α o *E.Coli* BL21-CodonPLUS) se descongelaron en hielo, se tomó una alícuota de 100 µl y se añadió entre 50-200 ng del plásmido con el cDNA que codifica para la porción extracelular de la proteína TRAIL, correspondiente a los aminoácidos 95 al 281 con una cola de 6 histidinas. Tras una incubación de 30 minutos en hielo, se procedió al choque térmico donde primero las bacterias se incubaron a 42 °C durante 90 segundos seguido del enfriado en hielo durante 2 minutos. La mezcla se diluyó con 1 ml de LB estéril y se incubó 1 hora a 37 °C, tiempo requerido para que las bacterias adquieran la resistencia al antibiótico de selección. Finalmente, se centrifugaron a 3000 g durante 3 minutos y 200 µl de la suspensión celular se sembró en una placa de LB-agar con el antibiótico correspondiente. Las placas sembradas se incubaron invertidas en la estufa toda la noche a 37 °C. Una vez hubieron crecido las colonias, se seleccionaron varias y se transfirieron cada una a un tubo con 10 ml de LB con el antibiótico de selección. Se incubaron a 37 °C toda la noche en un agitador orbital y finalmente se almacenaron a 4 °C.

3.2.1.4 Extracción de DNA plasmídico

Para obtener pequeñas cantidades de plásmido se partió de un volumen de 1,5-3 ml de cultivo bacteriano y para cantidades mayores el volumen empleado fue 50-100 ml. Los kits utilizados fueron *GFX™ Micro Plasmid Prep Kit* (GE Healthcare) y *Quantum Prep Plasmid Midiprep Kit* (Bio-Rad) respectivamente, siguiendo las indicaciones del fabricante. Las eluciones fueron realizadas con H₂O miliQ (50 y 500 µl).

3.2.1.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR se empleó para amplificar pequeños fragmentos de DNA. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l y los componentes fueron los siguientes:

	Volumen
Taq-DNA polimerasa (2,5 u/ml)	0,1 μ l
DNA plasmídico (10 pg-200 ng)	100 ng
Oligonucleótidos Forward/Reverse (10 μ M)	0,4 μ l
dNTPs (10 mM)	0,16 μ l
Buffer de reacción PCR 10x	2 μ l
H ₂ O miliQ	Hasta 20 μ l

La amplificación de la secuencia de TRAIL se llevó a cabo en un termociclador (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones:

- Hot Start 95 °C, 5 min.
 - Desnaturalización 95 °C, 30 seg.
 - Hibridación 61 °C, 30 seg.
 - Elongación 72 °C, 1 min.
 - Elongación final 72 °C, 7 min.
- } x 25 ciclos

3.2.1.6 Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Los geles utilizados para electroforesis de DNA fueron geles de agarosa al 1%. Para su preparación se pesaron 3 g de agarosa (Scharlau) y se disolvieron en 30 ml de TBE 1x (Gibco) o TAE 1x (Gibco), en función de si se destinarán al análisis o a la purificación de fragmentos. Tras la correcta disolución de la agarosa mediante calentamiento, se añadió 3 μ l de *SYBR-safe* (1:10000, Invitrogen) antes de gelificar y se vertió en los moldes. A las muestras se le añadió tampón de carga 10x (Takara) y se empleó un marcador de pesos moleculares (TrackIt 1 kb/100 pb ladder, Biotools) para estimar el peso de los

fragmentos de DNA de las muestras. Las condiciones de la electroforesis fueron 90 V, 400 mA, durante 30-60 minutos. Los geles se visualizaron en un transiluminador GelDoc 2000 (BioRad).

3.2.2 Expresión y purificación de TRAIL recombinante en condiciones nativas

La proteína recombinante de TRAIL purificada corresponde a la porción extracelular (aminoácidos 95-281) de la proteína nativa a los que se les ha incorporado una cola de 6 histidinas (TRAIL-His6), y que se encuentra clonado en el plásmido pET28a, cedido amablemente por la Dra. Marion Mcfarlane.

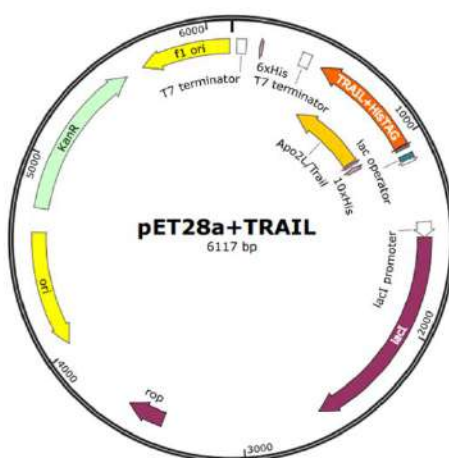


Figura 3.2 Mapa del plásmido utilizado para sobre-expresar TRAIL en *E.Coli* BL21-CodonPLUS

Las bacterias *E.Coli* BL21-CodonPLUS fueron transformadas mediante choque térmico (Apartado 3.2.1.3) y sembradas en placas LB-agar con 50 µg/ml de kanamicina. Tras toda la noche en la estufa a 37 °C, se seleccionó una colonia, se traspasó a medio LB estéril con 50 µg/ml de kanamicina y se dejó incubar toda la noche a 37 °C en agitación. Al día siguiente, una alícuota de 1 ml se transfirió a 50 ml de LB estéril con 50 µg/ml de kanamicina y suplementado con glucosa 1 mg/ml, y se dejó crecer el cultivo durante toda la noche a 37 °C en agitación. Finalmente se trasvasaron 25 ml del cultivo bacteriano a 500 ml de LB

estéril (sin suplementar) y se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar la densidad óptica óptima ($DO_{600nm}=0.6-0.8$). Cuando las células se encontraron en este punto de crecimiento exponencial, el medio bacteriano se dejó enfriar en hielo durante 30 minutos y se procedió a la inducción del cultivo mediante IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) a 1 mM. Tras la adición se dejó reposar en hielo otros 30 minutos y finalmente se incubó la mezcla a 25 °C durante 7 horas. Se procedió a hacer 2 lavados con PBS y el *pellet* celular se congeló a -80 °C.

La lisis de las bacterias se llevó a cabo mediante lisis química y sonicación. Para ello se resuspendió el *pellet* bacteriano en 20 ml de *Lisis Buffer* de Sonicación al que se le había añadido previamente DTT 2 mM, 50 μ g/ml de lisozima, DNasa I 5 U/ml e inhibidor de proteasas (400 μ l de un stock 50x, Roche). La mezcla se incubó a 4 °C en rotación durante 2 horas y se sometió a sonicación (UP2005, Dr.Hielscher) bajo unas condiciones de 10 ciclos (30 s/ciclo), 0,5 *setting* de ciclo y 70 de amplitud. El lisado celular se centrifugó a 20000 g 30 minutos a 4 °C, la fase soluble se recolectó y se le añadió 1 ml de resina de cobalto previamente equilibrada (IMAC HisPur™, Pierce). La mezcla permaneció en rotación a 4 °C durante 1 hora y se centrifugó a 600 g durante 2 minutos para recuperar la resina, que fue lavada 3 veces con *Wash Buffer*. La elución se llevó a cabo con 3 ml de *Elution Buffer* y fue recogida en fracciones (500 μ l/fracción). Las fracciones fueron analizadas mediante SDS-PAGE y tinción con *Coomassie* para observar su nivel de concentración y pureza. Las fracciones óptimas se mezclaron para dar un volumen de proteína que se sometió a centrifugación en un tubo de fondo cónico Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units (EMD Milipore) para cambiar el medio disolvente por PBS y concentrar hasta obtener un volumen final de aproximadamente 1 ml. El método BCA (Apartado 3.2.3.3) fue el usado para determinar la concentración final de proteína la cual se alicuotó y almacenó a -80 °C.

3.2.3 Técnicas basadas en proteínas

3.2.3.1 Análisis de la expresión de proteínas en la superficie celular

Las proteínas presentes en la parte externa de la membrana plasmática se analizaron mediante la unión de anticuerpos específicos con un fluoróforo acoplado (Tabla 3.1).

Las células (aproximadamente 1×10^5 células/marcale) se lavaron 2 veces con PBS suplementado con 5% de SFB, centrifugándose a 600 g durante 5 minutos. El SFB tiene la función de bloquear las posibles uniones inespecíficas del anticuerpo. Seguidamente, las células se incubaron con una disolución del anticuerpo de interés diluido en PBS con un 5% de SFB a la concentración indicada por la casa comercial (Apartado 3.1.3). En paralelo se realizó un marcaje con el mismo número de células y la misma cantidad de anticuerpo del control de isotipo. Tras un periodo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, las células se centrifugaron a 600 g durante 5 minutos y se lavaron con PBS al 5% de SFB. Finalmente se traspasaron a tubos de citometría (Falcon) y se procedió al análisis de la muestra con un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) con el software CellQuest Pro 6.0. El análisis de los datos se realizó con el programa FlowJo 7.6.1.

Tabla 3.1 Propiedades de los fluoróforos conjugados con anticuerpos.

Nombre	Abrev.	$\lambda_{\text{excitación}}$	$\lambda_{\text{emisión}}$	Canal
Isocianato de fluoresceína	FITC	494 nm	518 nm	1
Alexa Fluor® 488		496 nm	519 nm	1
DyLight™ 488		493 nm	519 nm	1
Ficoeritrina	PE	495 nm	578 nm	2

3.2.3.2 Extracción de proteínas celulares totales

Las células sometidas a distintos tratamientos (aproximadamente 5×10^6 células/condición) se recolectaron y tras ser lavadas con PBS un mínimo de 2 veces, se resuspendieron en tampón de lisis. La proporción es 20 μ l de tampón

de lisis por cada 10^6 células. Las células se incubaron durante 30 minutos en hielo y se centrifugaron a 20800 g, 4 °C durante 30 minutos. El sobrenadante se recolectó en tubos y se determinó su concentración mediante el método BCA (Apartado 3.2.3.3). Las muestras se guardaron a -20 °C para su conservación.

3.2.3.3 Cuantificación de proteínas

El ensayo del ácido bicinconínico (BCA) fue el empleado para determinar la concentración de proteínas. Para ello se utilizó el kit *Micro BCA™ Protein Assay Kit* (Thermo Scientific) y se siguieron las indicaciones del fabricante. Finalmente la reacción colorimétrica se midió a 550 nm en un lector de placas (Multiskan EX, Thermo Scientific).

3.2.3.4 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis)

La técnica de cromatografía empleada para la separación de proteínas en función del peso molecular fue SDS-PAGE, utilizando geles de acrilamida/bis-acrilamida con 0,1% de SDS (condiciones desnaturalizantes) hechos en el laboratorio. El porcentaje de acrilamida (Fisher BioReagents™) empleado para la preparación del gel dependió del tamaño de la proteína de interés (empleándose principalmente geles al 6% y al 12% de acrilamida). La composición de los diferentes geles (gel concentrador y el gel separador) fue la siguiente:

Reactivo	Gel concentrador	Gel separador	
	4%	6%	12%
H ₂ O _d	3 ml	4,2 ml	2,6 ml
30% Acrilamida	670 µl	1,6 ml	3,2 ml
Buffer stacking (Tris 1 M, pH 6,8)	1,3 ml	-	-
Buffer resolving (Tris 1,5 M, pH 8,8)	-	2 ml	2 ml
10% SDS	50 µl	100 µl	100 µl
10% APS	150 µl	150 µl	150 µl
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl

A la hora de realizar el análisis por SDS-PAGE, las muestras se descongelaron en hielo, se igualaron concentraciones diluyendo con el volumen necesario de tampón de lisis y se añadió tampón de carga 3x. Las muestras se calentaron a 98 °C durante 5 minutos y junto con el marcador de pesos moleculares (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo) fueron cargados en los distintos carriles del gel. La electroforesis fue llevada a cabo en el tampón de carrera y bajo las condiciones iniciales de 90 V y 20 mA/gel durante 15 minutos, seguido de 180 V durante 2 horas al mismo amperaje.

3.2.3.5 Tinción de Coomassie

Los geles de poliacrilamida, una vez acabado el proceso de electroforesis, se lavaron con H₂O destilada y se incubaron con el tampón de tinción *Coomassie* en un agitador (Shaker DOS-20L, ELMi) a temperatura ambiente durante 1 hora. Seguidamente se retiró el colorante y se añadió disolución decolorante permaneciendo toda la noche en el agitador a temperatura ambiente.

3.2.3.6 Técnica de Western blot

Las proteínas presentes en el gel de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond C-extra, GE Healthcare) mediante una transferencia semi-seca con un equipo de transferencia (BioRad). La colocación del gel, la membrana y los papeles esponja (GE Healthcare) fue en modo *sandwich*, evitando la formación de burbujas, y en tampón de transferencia. Las condiciones de la transferencia fueron 20 V, 400 mA durante 75 minutos. Una vez acabado el proceso se tiñó la membrana con rojo *Ponceau* (Merk), para comprobar la eficiencia de la transferencia, y se bloqueó con una disolución de leche desnatada en polvo al 5% en tampón B (1 g/l de timerosal y 50 ml/l de Tween) durante 30 minutos en agitación.

Los anticuerpos primarios se prepararon a la concentración adecuada (Apartado 3.1.3) en el tampón *Antibody Solution Buffer*. Se seleccionó aquel anticuerpo cuyo antígeno corresponde con la proteína de interés. Dicha solución de anticuerpo primario se incubó con la membrana, que previamente había sido

lavada con tampón B (3 lavados de 5 minutos cada lavado) para eliminar los restos de leche desnatada, durante un periodo de 16-24 horas a 4°C en agitación.

Tras la incubación se recogió la solución del anticuerpo, que se almacenó a 4 °C para ser reutilizado, y la membrana se sometió a 3 lavados de 5 minutos con tampón B.

El anticuerpo secundario, escogido según la especie correspondiente del anticuerpo primario (ratón, conejo o cabra) se encuentra conjugado con HRP (*horseradish-peroxidase*) (todos de Sigma). Éste se diluyó a una concentración 1:10000 en tampón B con 2,5% de leche desnatada en polvo. La membrana se incubó con la disolución de anticuerpo secundario durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Tras 3 lavados de 5 minutos cada uno, se añadió la solución ECL (*enhanced chemoluminescence*) (Thermo Fischer Scientific) distribuyéndose de forma homogénea por toda la superficie de la membrana. Se dejó reaccionar el sustrato durante 2 minutos a temperatura ambiente y se empleó el aparato de revelado Amersham Image 600 (GE Healthcare) para obtener las imágenes.

El proceso se repitió para cada proteína que se deseó analizar.

3.2.4 Generación de nanopartículas lipídicas

3.2.4.1 Preparación de liposomas tipo LUV

Los lípidos que constituyen la capa lipídica de las nanopartículas se mezclaron en una proporción determinada (Tabla 3.2), semejante a la composición de los exosomas fisiológicos. La mezcla se realizó de forma independiente en la base de varios tubos pequeños de fondo cónico. El disolvente donde se encuentran disueltos los lípidos se evaporó bajo corriente de nitrógeno durante 10 minutos y las posibles trazas se eliminaron por secado al vacío a 45 °C durante un mínimo de 6 horas. La fina lámina de mezcla lipídica resultante se hidrató con PBS permitiendo la formación de estructuras esféricas con varias capas lipídicas llamadas MLVs (*Multilamellar Vesicles*).

La obtención de los liposomas tipo LUV (*Large Unilamellar Vesicle*) a partir de MLVs se produjo mediante 2 ciclos de congelación-descongelación, obteniéndose así LOV (*Large Oligolamellar Vesicle*), las cuales se sometieron a 10 ciclos de extrusión bajo flujo de nitrógeno utilizando un aparato *Extruder* (Northern Lipids) al que se le incorporó 2 membranas de policarbonato de 200 nm de diámetro (Whatman Nuclepore™ Track-Etched, Schleicher & Schuell).

También se generaron liposomas que carecían en su composición del lípido quelante DOGS-NTA-Ni (LUV.0). Éstos fueron utilizados en algunos experimentos como control, ya que se asegura la ausencia de unión de TRAIL por interacción con el níquel presente en el lípido a la superficie del liposoma. A la composición lipídica tradicional también se le añadió el lípido polietilenglicol (PEG), generándose la formulación LUV-PEG. Este lípido mejora las propiedades de los LUV en cuanto a estabilidad dimensional.

Tabla 3.2 Composición lipídica estándar de los LUV

		LUV clásicos	LUV.0	LUV-PEG
Fosfatidilcolina	% Molar	55%	57,50%	50%
	Concentración	2,75 mM	2,875 mM	2,5 mM
Esfingomielina	% Molar	30%	31,50%	30%
	Concentración	1,5 mM	1,575 mM	1,5 mM
Colesterol	% Molar	10%	11%	10%
	Concentración	0,5 mM	0,55 mM	0,5 mM
DOGS-NTA-Ni	% Molar	5%	-	5%
	Concentración	0,25 mM	-	0,25 mM
PEG	% Molar	-	-	5%
	Concentración	-	-	0,25 mM

3.2.4.2 Variación en la composición lipídica de los LUV

Además de la formación de liposomas con una composición lipídica semejante a los exosomas fisiológicos (LUV clásicos, Tabla 3.2), se generaron LUV con distinta proporción de lípidos en su membrana y LUV con nuevos componentes lipídicos.

En primer lugar se modificó la cantidad de esfingomieline presente en los liposomas, variando así el porcentaje molar de los distintos lípidos salvo DOGS-NTA-Ni que permaneció constante en todos los casos (Tabla 3.3).

Tabla 3.3 Composición lipídica de los LUV modificando la proporción de esfingomieline.

		LUV clásicos	LUV SM 0%	LUV SM 60%	LUV SM 80%
Fosfatidilcolina	% Molar	55%	89%	25,8%	5%
	Concentración	2,75 mM	4,45 mM	1,29 mM	0,25 mM
Esfingomieline	% Molar	30%	-	60%	80%
	Concentración	1,5 mM	-	3 mM	4 mM
Colesterol	% Molar	10%	6%	9,2%	10%
	Concentración	0,5 mM	0,3 mM	0,46 mM	0,5 mM
DOGS-NTA-Ni	% Molar	5%	5%	5%	5%
	Concentración	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM

En el caso de la fosfatidilcolina, se modificaron los porcentajes molares de todos los lípidos a excepción de DOGS-NTA-Ni, cuya variación no supera el 1% con respecto a los LUV clásicos (Tabla 3.4).

Tabla 3.4 Composición lipídica de los LUV modificando la proporción de fosfatidilcolina.

		LUV clásicos	LUV PC 5%	LUV PC 96%
Fosfatidilcolina	% Molar	55%	5%	96,0%
	Concentración	2,75 mM	0,25 mM	4,8 mM
Esfingomieline	% Molar	30%	80%	0%
	Concentración	1,5 mM	4 mM	0 mM
Colesterol	% Molar	10%	10%	0,0%
	Concentración	0,5 mM	0,5 mM	0 mM
DOGS-NTA-Ni	% Molar	5%	5%	4%
	Concentración	0,25 mM	0,25 mM	0,2 mM

También se generaron LUV con distinta proporción de colesterol, los cuales presentaban la misma concentración de esfingomielina y DOGS-NTA-Ni, pero variaciones en los porcentajes molares de fosfatidilcolina (Tabla 3.5).

Tabla 3.5 Composición lipídica de los LUV modificando la proporción de colesterol.

		LUV clásicos	LUV CHOL 20%	LUV CHOL 30%	LUV CHOL 40%	LUV CHOL 50%
Fosfatidilcolina	% Molar	55%	45%	35%	25%	15%
	Concentración	2,75 mM	2,25 mM	1,75 mM	1,25 mM	0,75 mM
Esfingomielina	% Molar	30%	30%	30%	30%	30%
	Concentración	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM
Colesterol	% Molar	10%	20%	30,0%	40%	50%
	Concentración	0,5 mM	1 mM	1,5 mM	2 mM	2,5 mM
DOGS-NTA-Ni	% Molar	5%	5%	5%	5%	5%
	Concentración	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM

Los análogos alquil-lisofosfolípidos (ALPs) son un grupo de moléculas lipídicas con actividad antitumoral. La edelfosina (1-O-octadecil-2-O-metilrac-glicero-3-fosfocolina, EDF) es un éter lípido ALP que destaca entre todos ellos por su gran capacidad citotóxica antitumoral [364]. En base a ello, se generaron liposomas incorporando distintas concentraciones de EDF en la composición lipídica, eliminándose por completo la esfingomielina de la formulación estándar (Tabla 3.6).

Tabla 3.6 Composición lipídica de los LUV incorporando distintas concentraciones de edelfosina.

		LUV-EDF 0	LUV-EDF 60	LUV-EDF 120	LUV-EDF 240	LUV-EDF 480
Fosfatidilcolina	% Molar	55%	83,8%	82,6%	80,2%	75,4%
	Concentración	2,75 mM	4,2 mM	4,13 mM	4,01 mM	3,77 mM
Esfingomielina	% Molar	30%	-	-	-	-
	Concentración	1,5 mM	-	-	-	-
Colesterol	% Molar	10%	10%	10%	10%	10%
	Concentración	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM
DOGS-NTA-Ni	% Molar	5%	5%	5%	5%	5%
	Concentración	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM
Edelfosina	% Molar	-	1,20%	2,40%	4,80%	9,60%
	Concentración	-	60 μ M	120 μ M	240 μ M	480 μ M

Para estudiar el posible mayor potencial citotóxico de los LUV-EDF con TRAIL en superficie, se realizaron ensayos comparativos de LUV-EDF-TRAIL frente a LUV-EDF en combinación con TRAIL (en forma soluble sTRAIL o asociado a liposomas, LUV-TRAIL). Para ello se emplearon unos LUV-EDF carentes de DOGS-NTA-Ni (LUV.0-EDF), asegurándose así la ausencia de unión por contacto de TRAIL a la superficie (Tabla 3.7).

Tabla 3.7 Composición lipídica de los LUV-EDF en ausencia del lípido quelante DOGS-NTA-Ni.

		LUV.0-EDF 0	LUV.0-EDF 120	LUV.0-EDF 240
Fosfatidilcolina	% Molar	57,50%	85,1%	82,7%
	Concentración	2,875 mM	4,255 mM	4,135 mM
Esfingomielina	% Molar	31,50%	-	-
	Concentración	1,575 mM	-	-
Colesterol	% Molar	11%	12,5%	12,5%
	Concentración	0,55 mM	0,625 mM	0,625 mM
DOGS-NTA-Ni	% Molar	-	-	-
	Concentración	-	-	-
Edelfosina	% Molar	-	2,40%	4,80%
	Concentración	-	120 μ M	240 μ M

3.2.4.3 Generación de LUV-TRAIL

Las nanopartículas lipídicas LUV se incubaron con sTRAIL a 37 °C en agitación a 750 rpm durante 30 minutos. Los residuos de histidina que contiene un extremo de la proteína soluble interaccionan con el átomo de níquel presente en el lípido artificial DOGS-NTA-Ni, permitiendo el anclaje de la proteína a la superficie del liposoma en la posición correcta. La cantidad de proteína unida a la superficie está limitada por el espacio disponible, ya que los impedimentos estéricos determinan un máximo de proteína presente en la superficie de los LUV. Estudios anteriores determinaron que el ratio óptimo μg proteína/ μmol total lipídico era 4,8. Es por tanto que incubados en tales cantidades, la concentración final de TRAIL es 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$, mientras que la concentración final de lípido es 2,5 mM. Las concentraciones se ajustan con el volumen necesario de PBS.

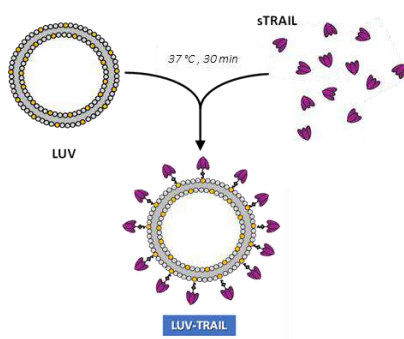


Figura 3.3 Esquemización del proceso de formación de LUV-TRAIL. Tesis doctoral “*Highly bioactive TRAIL formulations based on lipid nanoparticles*” (Diego de Miguel Samaniego).

3.2.4.4 Generación de LUVDOX y LUVDOX-TRAIL

La encapsulación de doxorrubicina (DOX) en los liposomas se realizó utilizando unos LUV-PEG cuyo lumen presenta pH ácido, llamados LUV-AS. La preparación se realizó siguiendo un protocolo similar al de los liposomas clásicos, con la diferencia de que la mezcla lipídica seca, presente en la base de los tubos, se hidrató con una disolución de sulfato de amonio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ 300 mM y pH 4. Tras los ciclos de extrusión, los liposomas se sometieron a una cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna PD-10 de sefarosa (tamaño de

retención 85-260 μm , GE Healthcare), que permitió sustituir y cambiar el pH del medio externo por buffer PBS. Los LUV-AS finalmente generados presentan un pH interno mucho menor que el del medio externo, lo que genera un gradiente de pH que permite la encapsulación de compuestos como DOX [365, 366]. Esta molécula presenta una característica que favorece su retención en el interior del lumen, debido a que el medio ácido genera una protonación en la molécula que impiden su difusión al exterior, quedando atrapada dentro de la nanopartícula lipídica.

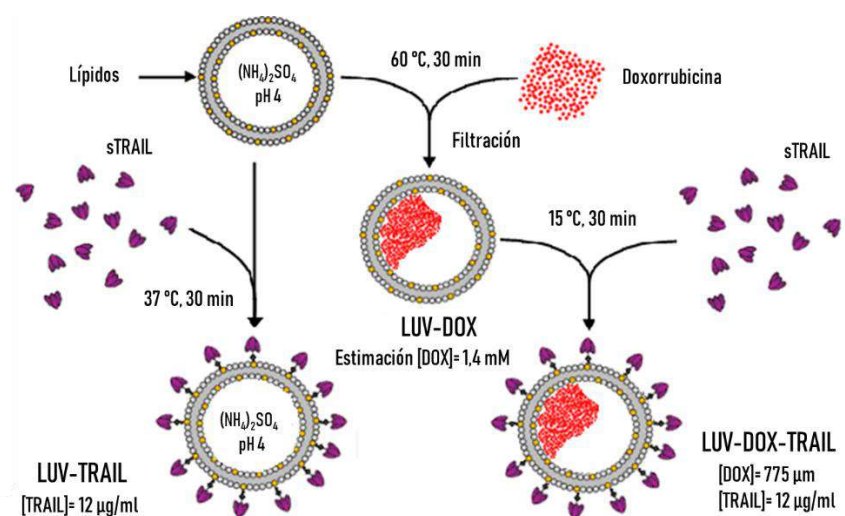


Figura 3.4 Esquemización del proceso de formación de LUV-TRAIL, LUVDOX y LUVDOX-TRAIL. Modificado de la tesis doctoral *“Highly bioactive TRAIL formulations based on lipid nanoparticles”* (Diego de Miguel Samaniego).

El proceso de encapsulación se realiza incubando DOX con LUV-AS a un ratio molar droga/lípido de 1/3,8. La mezcla resultante se incubaba a 60 °C (temperatura a la cual la membrana lipídica se hace más fluida) durante 30 minutos con agitación de 750 rpm. La formulación resultante se denominó LUVDOX. El acoplamiento de TRAIL a la superficie de los LUVDOX se realizó de forma posterior y similar al de los liposomas clásicos, incubando LUVDOX con la cantidad adecuada de TRAIL un periodo de 30 minutos a 15 °C y 450 rpm. El compuesto resultante se denominó LUV-DOX-TRAIL. También se generaron

nanopartículas LUVDOX y LUVDOX-TRAIL con una concentración diez veces menor de DOX (1/10), manteniendo la concentración de TRAIL en superficie. Las concentraciones de los distintos componentes presentes en los liposomas generados se reflejan en la siguiente tabla:

	Lípido (mM)	TRAIL (µg/ml)	Doxorrubicina (µM)
LUV-TRAIL	2,5	12	-
LUVDOX	2,5	-	775
LUVDOX-TRAIL	2,5	12	775
LUVDOX 1/10	2,5	-	77,5
LUVDOX-TRAIL 1/10	2,5	12	77,5

La eficiencia del método de gradiente de pH empleado para la encapsulación de la doxorrubicina en los LUV-AS, así como la comprobación del anclaje de TRAIL a la superficie de LUVDOX fue analizada previamente en nuestro laboratorio [367].

3.2.4.5 Estudio de la encapsulación de flavopiridol dentro de liposomas

Se utilizaron 2 tipos de liposomas para la encapsulación de flavopiridol (FVP): LUV-AS (Apartado 3.2.4.4) y LUV-AS CHOL (semejantes a los LUV CHOL 40%, Tabla 3.5, con pH ácido en el lumen).

Al igual que con DOX, el método de gradiente de pH fue el utilizado para llevar a cabo la encapsulación de FVP [368]. En este caso, el ratio molar droga/lípido fue 1/1,9 quedando unas concentraciones finales de droga y lípido de 350 µM y 2,5 mM respectivamente. La mezcla se incubó a 60 °C en agitación a 750 rpm un tiempo máximo de 2 horas, tras lo cual se sometió a cromatografía de exclusión molecular utilizando columnas PD-10 de sefarosa (tamaño de retención 85-260 µm, GE Healthcare), eliminando así el FVP no encapsulado presente en el medio. Los liposomas así generados se denominaron LUV-FVP.

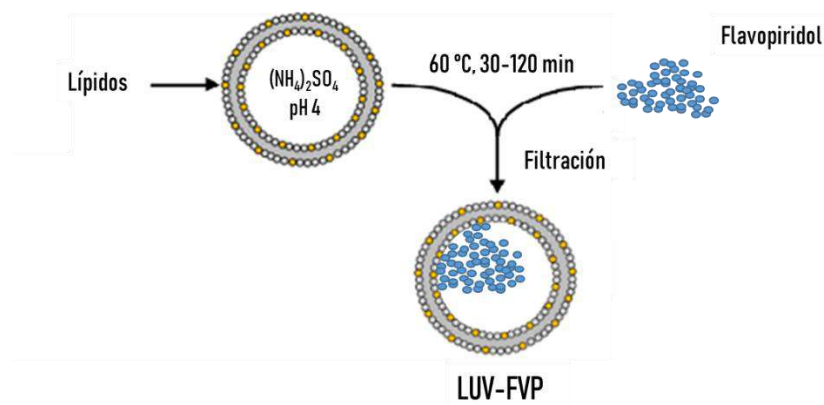


Figura 3.5 Esquematzación del proceso de formación de LUV-FVP. Modificado de la tesis doctoral *“Highly bioactive TRAIL formulations base don lipid nanoparticles”* (Diego de Miguel Samaniego).

El análisis de la eficiencia de encapsulación se realizó midiendo la concentración de FVP dentro de los LUV-FVP tras la incubación a distintos tiempos. Para ello se fueron tomando alícuotas a lo largo del periodo de incubación (30, 60 y 120 minutos) y tras eliminar el FVP no encapsulado por cromatografía de exclusión, los liposomas fueron disgregados liberando el FVP encapsulado al medio. Para la lisis de los liposomas se utilizaron 2 técnicas: disolución con Triton-X100 (Sigma) al 1% en PBS y sonicación (2 ciclos de 30 s/ciclo y 70 de amplitud).

El valor de absorbancia de las muestras, medidas a 269 nm, permitió determinar la concentración de FVP encapsulado al referenciar los datos a una recta patrón. De esta forma se pudo calcular el porcentaje de encapsulación.

Posteriormente, de forma equivalente al proceso obtención de LUVDOX-TRAIL, se realizó el anclaje de TRAIL a la superficie de LUV-FVP, generando LUV-FVP-TRAIL.

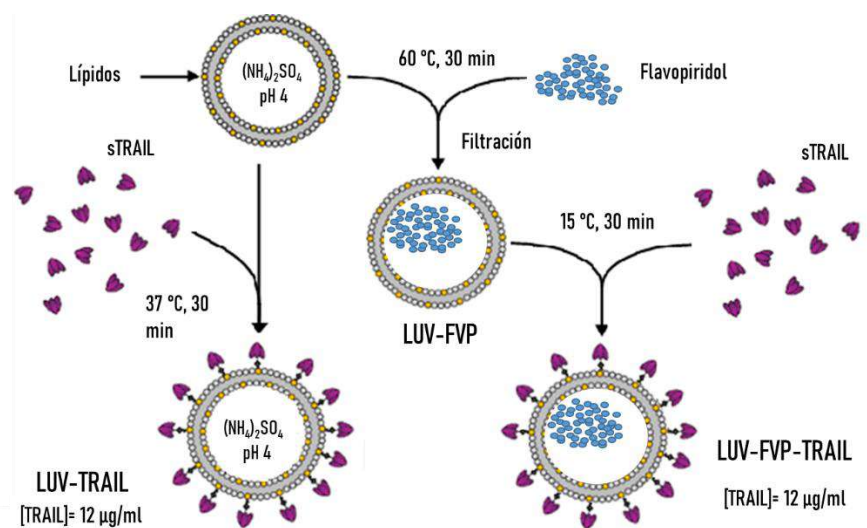


Figura 3.6 Esquematzación del proceso de formación de LUV-TRAIL, LUV-FVP y LUV-FVP-TRAIL. Modificado de la tesis doctoral “Highly bioactive TRAIL formulations base don lipid nanoparticles” (Diego de Miguel Samaniego).

3.2.5 Cultivos celulares

3.2.5.1 Congelación y descongelación de líneas celulares

Las células destinadas a criopreservación, se expandieron en cultivo hasta llegar al punto de confluencia en el frasco de cultivo (TPP, Switzerland). Una vez alcanzado, las células se recolectaron y se centrifugaron a 340 g, 5 minutos. El *pellet* celular se resuspendió en una disolución de SFB al 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). Rápidamente la suspensión celular se traspasó a tubos de criopreservación (Thermo Scientific) y se almacenaron a -80 °C durante un periodo de aproximadamente 2 días. Finalmente se guardaron en tanques que contenían nitrógeno líquido.

Para llevar a cabo el proceso de descongelación, se extrajo el vial deseado de células criopreservadas y se depositó rápidamente en hielo. Conforme se fueron descongelando las células al diluirlas en medio de cultivo estéril, se fueron recolectando en tubos de fondo cónico de 15 ml (Corning) y se centrifugaron a 340 g durante 5 minutos. Finalmente el *pellet* celular se

resuspendió en medio de cultivo estéril y se sembró en frascos de cultivo, que se incubaron en la estufa a 37 °C.

3.2.5.2 *Mantenimiento del cultivo celular*

Las células se incubaron de forma rutinaria en un incubador termostatzado (Hera-Cell 150, Heraeus), a 37 °C, en aire saturado de humedad y con un 5% de CO₂. El medio de cultivo empleado para las células adherentes fue DMEM, mientras que para las células en suspensión se utilizó RPMI-1640 (ambos de GIBCO). Los medios se suplementaron con 10% SFB (Pan-Biotech), L-glutamina 2 mM (Glutamax™, GIBCO) y una mezcla de antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml, Sigma). Al medio suplementado se le denominó medio completo.

Para el mantenimiento de los cultivos, las células en suspensión se ajustaron con medio completo a una densidad de 3x10⁵ células/ml cada 2-3 días. Los pasajes de células adherentes se realizaron aproximadamente cada 2 días, despegando las células con una solución de tripsina/EDTA (Pan-Biotech) y diluyendo las células en medio completo, de tal forma que las células se mantuvieran bajo el punto de confluencia.

Todos los procedimientos descritos se realizaron en campanas de flujo laminar vertical (Telstar), asegurando así las condiciones de esterilidad.

La determinación de la densidad celular y la viabilidad se realizó mediante la tinción de las células con una disolución de azul tripán (Sigma). Éstas se colocaron en una cámara de *Neubauer* y con ayuda de un microscopio óptico (Eclipse 50i, Nikon) se llevó a cabo el conteo celular.

3.2.5.3 *Obtención de células primarias tumorales a partir de muestras de pacientes con sarcoma*

Las células primarias tumorales fueron obtenidas de muestras de tejido procedentes de extracciones quirúrgicas de pacientes afectados por distintas tipologías de sarcoma. Todas las muestras fueron recolectadas tras obtener

previamente el consentimiento informado del paciente para la donación de la muestra. Este procedimiento fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEICA, código C.I. PI16/0127).

El tejido tumoral se sometió a disociación mecánica hasta obtener una suspensión celular. Se realizaron 2 lavados con medio completo DMEM y el *pellet* celular se resuspendió en aproximadamente 5 ml de medio completo DMEM. Se determinó la densidad y viabilidad celular mediante tinción con azul tripán. Seguidamente se llevó a cabo un análisis de la expresión de receptores de TRAIL en superficie (Apartado 3.2.3.1). También se realizaron ensayos de citotoxicidad, para lo cual se sembraron las células a una densidad dependiente del tamaño celular (entre $30\text{-}50 \times 10^3$ células/pocillo) en una placa de 96 pocillos (TPP, Switzerland). Las células sembradas se mantuvieron en el incubador a 37 °C un mínimo de 2 días antes de realizar los experimentos.

3.2.6 Estudios de proliferación y muerte celular

3.2.6.1 Determinación de la viabilidad celular

La cuantificación de la viabilidad celular tras distintos tratamientos se llevó a cabo mediante una modificación del método de *Mossman*. Para ello se sembraron $2,5 \times 10^4$ células/pocillo sobre una placa de 96 pocillos de fondo plano, con un mínimo de 3 pocillos por punto experimental. Una vez que las células estuvieron adheridas a la superficie de la placa, se aplicaron los diferentes tratamientos estudiados. Tras el tiempo estipulado para cada experimento, con una pipeta de repetición se añadió a cada pocillo 10 μl de una disolución 5 mg/ml de dimetil-tiazolil-tetrazolio (MTT, Sigma). La placa se incubó durante 2-3 horas hasta la formación de cristales de azul formazán. La reacción que se produce es la oxidación del compuesto bromuro de MTT por parte del metabolismo celular, de modo que la cantidad de cristales formados es proporcional al número de células viables, y por tanto, a la proliferación celular. Hay que tener en cuenta que hay 2 factores que determinan la proliferación celular: la inhibición del crecimiento y la muerte celular.

La placa, una vez se hubieron formado los cristales, se centrifugó a 4300 g durante 10 minutos y se retiró 70 µl/pocillo de medio con una micropipeta multicanal (Eppendorf). La disolución de los cristales (insolubles en medio acuoso) se realizó empleando un agitador de placas (Bioblock Scientific) tras la adición de 100 µl/pocillo de isopropanol/HCl 0,05 M. Una vez disueltos, la absorbancia fue medida en un lector de placas (Multiskan EX, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 550 nm, utilizando como blanco medio de cultivo sometido a los mismos procedimientos. Las absorbancias de cada punto experimental se refirieron al punto control (células sin tratar), calculando así el porcentaje de viabilidad celular.

3.2.6.2 Ensayo clonogénico

Se realizaron estudios clonogénicos para analizar la supervivencia celular a largo plazo tras el tratamiento con TRAIL en combinación con FVP. Para ello, se sembraron 1×10^5 células por pocillo en una placa de 6 pocillos. Al día siguiente, se añadió el tratamiento estipulado incubándose las células 24 horas. Se retiró el medio eliminando todas las células en suspensión, se realizó un lavado con PBS y se añadió medio completo. Tras aproximadamente 12 días de incubación, se retiró el medio completo y se realizaron 2 lavados con PBS, tras lo cual las células fueron fijadas con metanol durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se tiñeron con una disolución al 1% de cristal violeta (disuelto en 50% de etanol) y los restos de colorante de la superficie de la placa se limpiaron con agua destilada.

Al día siguiente, la placa fue escaneada, obteniéndose así el resultado gráfico del experimento. Seguidamente, se procedió a disolver los cristales para obtener un valor cuantitativo de absorbancia. Debido a que los cristales son insolubles en medio acuoso, se empleó el disolvente orgánico DMSO y un agitador de placas. Por cada punto experimental se tomaron 3 alícuotas de 100 µl que se traspasaron a una placa de 96 pocillos, la cual se introdujo en un lector de placas para medir la absorbancia de los distintos puntos a 550 nm.

3.2.6.3 *Determinación de la apoptosis y muerte celular mediante anexina-V y 7-AAD*

En el proceso de muerte celular por apoptosis tiene lugar un evento temprano que consiste en la traslocación de la fosfatidilserina desde la cara interna de la membrana celular a la externa, que en condiciones fisiológicas llevaría a la fagocitosis de la célula por parte de macrófagos. Este proceso puede determinarse mediante la unión específica de una proteína llamada anexina-V (marcada con algún fluoróforo) a dicho fosfolípido. Cuando el proceso de muerte celular está más avanzado, se produce la disgregación de la membrana celular citoplasmática así como de la membrana nuclear, permitiendo que moléculas como el 7-aminoactinomicina D (7-AAD) se trasloquen al núcleo y se intercalen en el DNA celular.

La detección y cuantificación de la muerte celular se realizó mediante el marcaje con las sondas anexina-V FITC/DY634 y/o 7-AAD, según el experimento lo requiera (Tabla 3.8). Para ello, se incubaron las células en una disolución de tampón de unión de anexina denominado tampón ABB con 1 μ l/condición experimental de la disolución comercial de anexina-V FITC/DY634 (Immunostep) y 2 μ l/condición experimental de la disolución comercial 7-AAD (Immunostep). Tras 20 minutos a temperatura ambiente, las células se recolectaron y se traspasaron a tubos de citometría (Falcon). El análisis se realizó con un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences), junto con el software CellQuest Pro 6.0.

Tabla 3.8 Propiedades de los fluoróforos utilizados en la detección de muerte celular.

Nombre	Abrev.	$\lambda_{\text{excitación}}$	$\lambda_{\text{emisión}}$	Canal
Isocianato de fluoresceína	FITC	494 nm	518 nm	1
7-aminoactinomicina D	7-AAD	488 nm	647 nm	3
DY634		635 nm	658 nm	4

3.2.7 Microscopía

3.2.7.1 Tinción nuclear mediante fluorescencia

La sonda empleada para la tinción de núcleos celulares fue *Hoechst 33342* (Life Technologies).

Se prepararon cubreobjetos de 13 mm con poli-L-lisina. Para ello, en una superficie plana, se colocaron los cubreobjetos sobre los que se extendió en su superficie 200 µl de poli-L-lisina (Poly-L-Lysine, Sigma). Tras 30 minutos de incubación, se retiró el exceso de poli-L-lisina y se realizaron 2 lavados con agua destilada. Los cubreobjetos se dejaron secar a temperatura ambiente y se colocaron en una placa de 24 pocillos en la posición correcta. Tras la esterilización bajo luz ultravioleta, se sembraron las células directamente sobre los cubreobjetos. Al día siguiente, se realizó el ensayo de citotoxicidad. A los tiempos indicados de finalización del experimento, se procedió a fijar los puntos experimentales. Para ello, la placa se centrifugó a 4700 g durante 5 minutos, adhiriendo así las posibles células en suspensión a la superficie del cubre, y se descartó el sobrenadante. Se realizaron 2 lavados con PBS y se añadió paraformaldehído (PFA) al 4% para la fijación. Tras el tiempo de incubación de 30 minutos a 4 °C, se realizaron 2 lavados con agua destilada y los cubreobjetos se colocaron cuidadosamente sobre una disolución de *Fluoromount-G* (Southern Biotech) con *Hoechst 33342* (1 µg/ml) en un portaobjetos (Fisher Scientific).

Las muestras fueron observadas en un microscopio de fluorescencia (Eclipse Ts2, Nikon), utilizando un sistema de fotografía digital (DXM 1200F, Nikon) con el software Nikon ACT-1 2.62.

3.2.7.2 Muestras histológicas

Las muestras de tejido, extraídas de los ratones al finalizar el experimento de toxicidad *in vivo* de LUVDOX-TRAIL (Apartado 3.2.8.2), se fijaron con 4% PFA (Panreac) y se enviaron al Servicio Científico Técnico de Anatomía Patológica del Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón (IIS Aragón), donde realizaron el

procesamiento (inclusión en parafina, cortes con el micrótopo y tinción con hematoxilina-eosina).

3.2.8 Experimentación *in vivo*

3.2.8.1 *Modelo animal de experimentación*

Los ensayos de experimentación animal se llevaron a cabo con ratones hembra de seis semanas de la cepa Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu}, proporcionados por la empresa JANVIER LABS. Los experimentos realizados fueron previamente aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (Referencia PI18/16) y se realizaron bajo las recomendaciones europeas, siguiendo la normativa RD 53/2013.

Todos los procedimientos se llevaron a cabo en el animalario del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS), bajo supervisión del Servicio Científico Técnico del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA).

El mantenimiento de los animales se realizó bajo condiciones estándar en ambiente libre de patógenos, con un rango medio de temperatura de 24 °C y con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas.

3.2.8.2 *Estudio de la toxicidad *in vivo* de LUVDOX-TRAIL*

La toxicidad de la formulación LUV-DOX-TRAIL se estudió empleando un grupo de cinco ratones. Los ratones se sometieron al tratamiento con LUVDOX-TRAIL, que consistió en 4 inyecciones intraperitoneales en intervalos de 2 días. En cada inyección se administraron 36 µg de TRAIL asociados a los LUVDOX con una concentración de DOX en los liposomas de 511,5 µM. El volumen inyectado fue 250 µl.

Tras 2 semanas de la finalización del tratamiento, a los ratones se les aplicó el punto final humanitario y se recolectaron órganos (bazo, hígado, riñón y ovario) y sangre mediante punción cardíaca. Los órganos fueron procesados, obteniendo finalmente muestras histológicas teñidas con hematoxilina-eosina

(Apartado 3.2.7.2), mientras que en el suero extraído a partir de la sangre del animal, se analizaron los niveles de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT).

3.2.8.3 Estudio de la actividad anti-tumoral in vivo de LUVDOX-TRAIL sobre células HT1080

La inoculación de células pertenecientes a la línea celular HT1080 (5×10^6 células/ratón) se llevó a cabo de forma subcutánea en un solo flanco del animal, en un volumen final de 100 μ l.

Se establecieron al azar 3 grupos de tratamiento:

- Control: Administración de PBS
- LT: Administración de LUV-TRAIL
- LDT: Administración de LUVDOX-TRAIL

El tratamiento se inició una vez el tumor alcanzó un volumen de 100 mm³. Las inyecciones se realizaron de forma intra-peritoneal durante 4 días consecutivos, administrando en un volumen final de 200 μ l, 36 μ g de TRAIL y una concentración de 224,2 μ M de DOX en el liposoma.

El crecimiento tumoral se monitorizó cada 1-2 días, recogiendo las mediciones de los parámetros de longitud (L), anchura (AN) y altura (AL) del tumor de cada ratón. El volumen tumoral se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = L \text{ (mm)} \times AN \text{ (mm)} \times AL \text{ (mm)}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estudio comparativo del efecto de TRAIL soluble y LUV-TRAIL sobre líneas celulares tumorales de sarcoma

4.1.1 Estudio de la citotoxicidad de sTRAIL y LUV-TRAIL sobre líneas celulares tumorales de sarcoma

Antes de realizar el estudio comparativo de la citotoxicidad de la forma soluble de TRAIL y los LUV-TRAIL en líneas tumorales de sarcoma, se llevó a cabo una primera caracterización de las células mediante el estudio de la expresión a nivel basal de las principales proteínas implicadas en la ruta apoptótica.

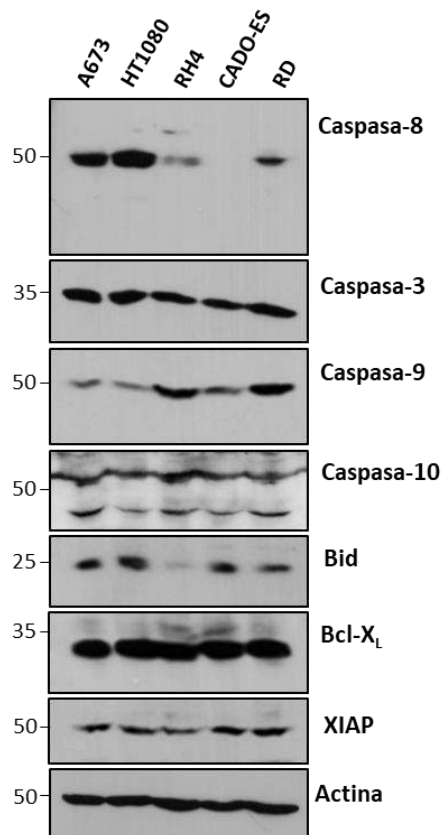


Figura 4.1 Análisis de la expresión de proteínas pro- y anti-apoptóticas en líneas celulares de sarcoma mediante la técnica *Western blot*.

En el estudio realizado mediante *Western blot*, mostrado en la Figura 4.1, se observó unos niveles de expresión semejantes entre las diferentes líneas celulares estudiadas para las proteínas caspasa-3, caspasa-10, Bcl-X_L y XIAP. Otras proteínas analizadas presentaron una variación en la cantidad relativa entre las distintas líneas celulares. En el caso de la caspasa-9, se observaron bajos niveles de expresión en las células A673, HT1080 y CADO-ES, en comparación con el resto de líneas celulares. Las células RH4 presentaron una deficiencia en Bid así como en caspasa-8, la cual estuvo totalmente ausente en la línea celular CADO-ES. Por el contrario, la caspasa-8 presentó altos niveles de expresión en la línea celular HT1080.

La interpretación del análisis de proteínas nos permitió anticipar una resistencia a la muerte inducida por TRAIL en las células RH4 y CADO-ES, en el caso de ésta última, debido a la completa carencia de caspasa-8, lo que impide iniciar la cascada efectora de la muerte celular por la vía extrínseca de la apoptosis. Las células RH4 presentaron bajos niveles no sólo de caspasa-8, que dificultaría activar de forma eficiente la ruta extrínseca, sino también de Bid, lo que impediría la amplificación de la señal apoptótica a través de la vía intrínseca de la apoptosis.

El siguiente paso fue analizar la sensibilidad de las diferentes líneas celulares a la apoptosis inducida por TRAIL. Para ello se realizó un estudio comparativo entre ambas formulaciones, sTRAIL y LUV-TRAIL, analizando el descenso de viabilidad celular a concentraciones crecientes de TRAIL. Los resultados se muestran en la Figura 4.2.

La mayor sensibilidad al efecto citotóxico de TRAIL lo presentaron las células A673, que llegaron a alcanzar un descenso de la viabilidad del 80% a la dosis máxima de TRAIL, sin presentar diferencias apreciables entre ambas formulaciones. Por otro lado, las líneas celulares HT1080 y RD presentaron perfiles de respuesta muy semejantes, observándose diferencias muy significativas entre sTRAIL y LUV-TRAIL a partir de la dosis de 111 ng/ml llegándose a reducir la viabilidad celular con la dosis máxima en

aproximadamente el 20% con sTRAIL y en el 60% con LUV-TRAIL. Las células RH4 y CADO-ES fueron resistentes al efecto de ambas formulaciones de TRAIL, dato que concuerda con las conclusiones obtenidas del análisis de proteínas anterior.

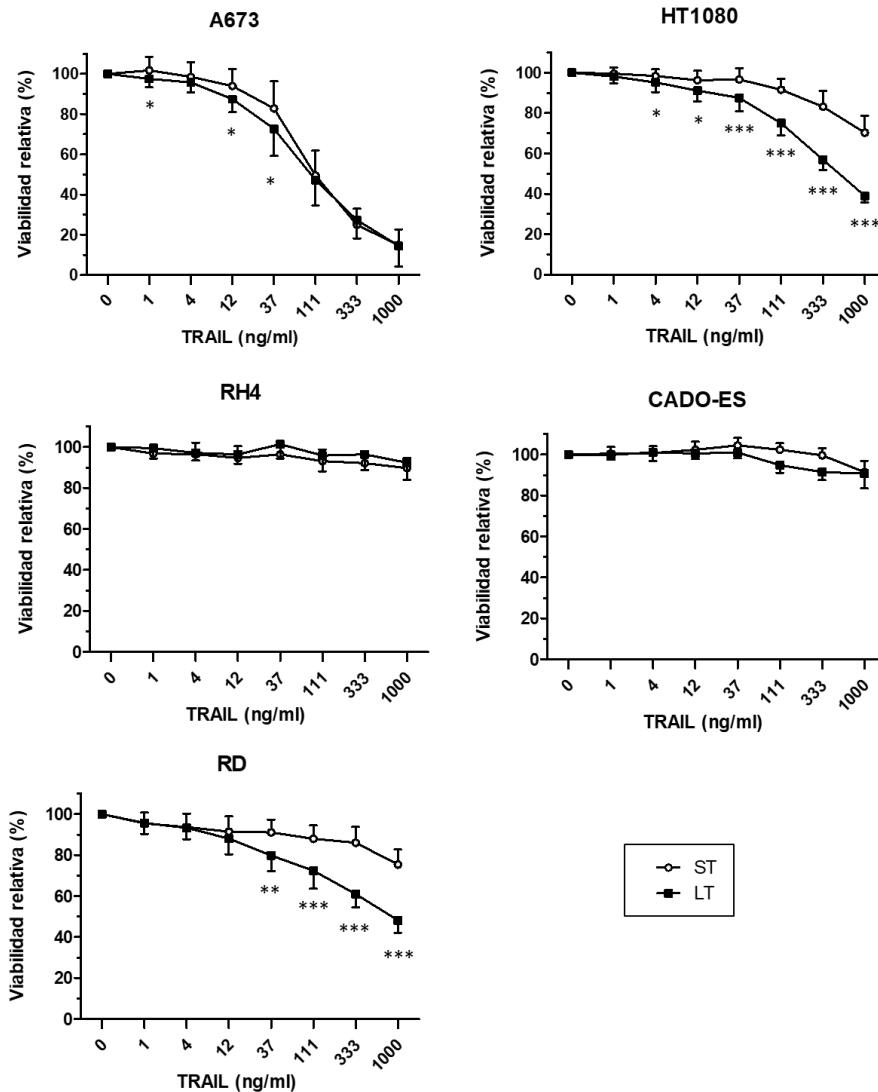


Figura 4.2 Ensayo dosis-respuesta de sTRAIL y LUV-TRAIL en líneas celulares de sarcoma. Las células fueron tratadas a concentraciones crecientes de TRAIL, tanto en la forma soluble (ST) como asociado a liposomas (LT) hasta un máximo de 1000 ng/ml, durante un periodo de 24 horas. Las gráficas muestran la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes (* p < 0,05, ** p < 0,005, *** p < 0,001, \pm 95% CI).

El descenso de la viabilidad celular observado en algunas líneas celulares de sarcoma puede no indicar necesariamente que se deba a un proceso de muerte celular. Es por ello que se realizaron experimentos empleando un análisis de citometría de flujo mediante el marcaje con anexina-V de las células tras la incubación con TRAIL, que permitía confirmar si el efecto de TRAIL observado corresponde a una muerte por apoptosis. Además, se emplearon en dichos experimentos distintos bloqueantes de algunas de las proteínas implicadas en la ruta apoptótica inducida por TRAIL que permitiría una mejor caracterización de la muerte celular. Los resultados del experimento se muestran en la Figura 4.3.

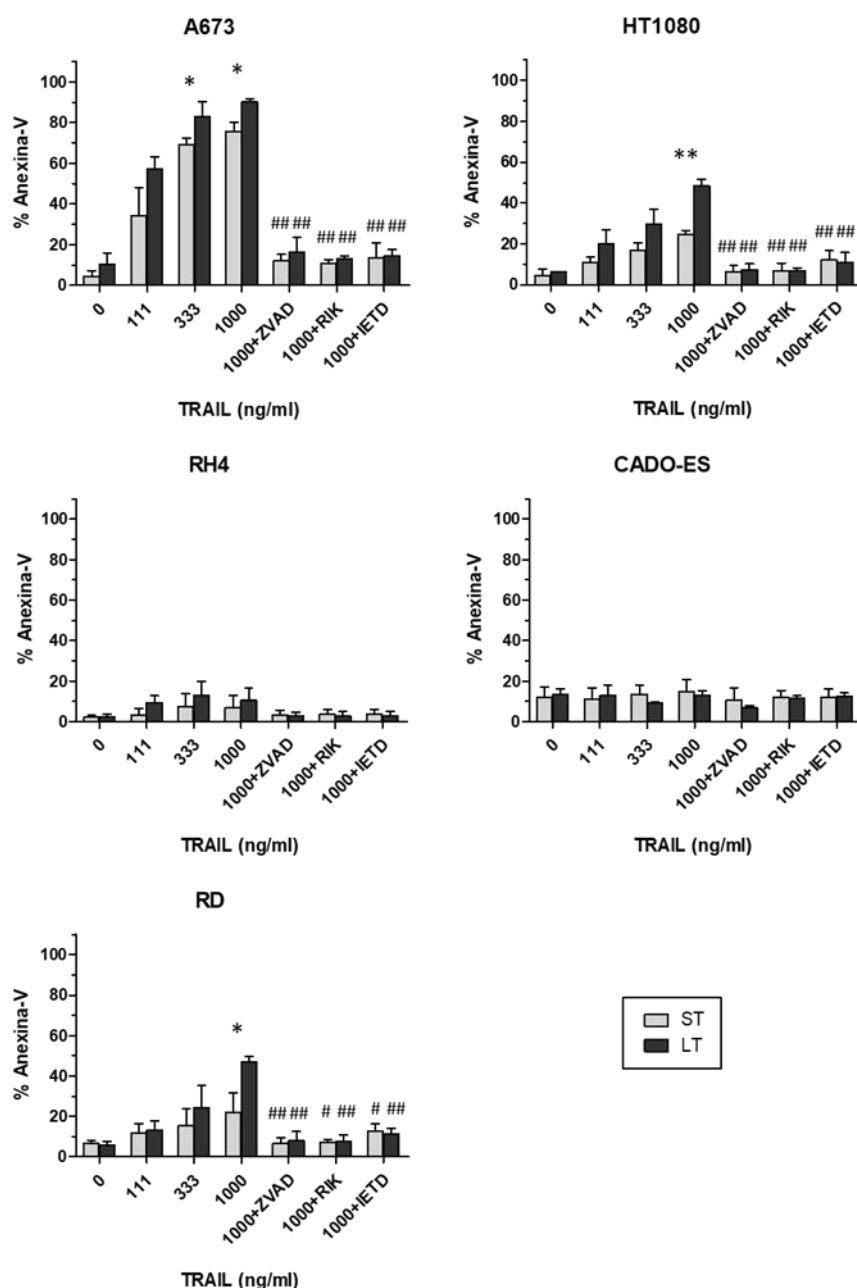


Figura 4.3 Caracterización de la muerte celular inducida por sTRAIL y LUV-TRAIL en líneas celulares de sarcoma. Las líneas celulares de sarcoma fueron tratadas con diferentes concentraciones de sTRAIL (ST) y LUV-TRAIL (LT). Adicionalmente, la dosis máxima de TRAIL se aplicó a células previamente incubadas con el anticuerpo bloqueante de TRAIL RIK, con el inhibidor de pan-caspasas z-VAD-fmk (ZVAD) y con el inhibidor específico de caspasa-8 z-IETD-fmk (IETD). Tras una incubación de 24 horas, la muerte celular se analizó mediante un marcaje con anexina-V. Las gráficas muestran la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Los asteriscos indican la significación entre ST y LT (* p <0,05, ** p <0,005, \pm 95%CI). Las almohadillas indican la significación entre ST/LT sólo y ST/LT combinado con el inhibidor (# p <0,05, ## p <0,005, \pm 95%CI).

Nuevamente, la línea celular A673 fue la más sensible a TRAIL, presentando una muerte celular por apoptosis dosis dependiente para ambas formulaciones. LUV-TRAIL presentó una mayor capacidad citotóxica que sTRAIL, siendo la diferencia del 15% a las dosis más altas, alcanzando valores significativos. El tratamiento con los bloqueantes RIK, z-VAD-fmk y z-IETD-fmk inhibieron casi en su totalidad la muerte celular en la línea celular A673.

En las líneas celulares HT1080 y RD también se observó un efecto dosis dependiente en la apoptosis inducida por TRAIL, presentando un perfil de muerte celular semejante en el tratamiento con las diferentes concentraciones de ambas formulaciones de TRAIL. En las dos líneas celulares, el porcentaje de muerte celular tras el tratamiento con LUV-TRAIL fue significativamente mayor que con sTRAIL, llegando a alcanzar el 50% de células anexina-V positivas en ambos casos. Los bloqueantes z-VAD-fmk, RIK y z-IETD-fmk restauraron los valores de muerte celular a los niveles basales.

En las células RH4 y CADO-ES no se observó apoptosis, permaneciendo resistentes al tratamiento con sTRAIL y LUV-TRAIL, lo que concuerda con los datos anteriores observados en la Figura 4.2.

El efecto del bloqueo de la apoptosis tras la pre-incubación con RIK y z-VAD-fmk observado en todas las líneas celulares sensibles a TRAIL, confirmó que la muerte celular en el caso de LUV-TRAIL se produce por una apoptosis inducida por TRAIL, donde las caspasas tienen un papel clave. Además, la inhibición prácticamente completa de la muerte celular con respecto al control tras la pre-incubación con z-IETD-fmk, parece indicar que la activación de la apoptosis por parte de LUV-TRAIL depende exclusivamente de la vía extrínseca iniciada por la caspasa-8. Así mismo, se puede concluir que la unión de TRAIL a la superficie de nanopartículas lipídicas mejora el potencial citotóxico de la proteína con respecto su forma soluble en células de sarcoma parcialmente resistentes a TRAIL.

Adicionalmente, se quiso estudiar la activación de la cascada apoptótica mediante el análisis del procesamiento de las diferentes proteínas implicadas en la apoptosis inducida por TRAIL. Para ello, se llevó a cabo un análisis mediante

Western blot en las tres líneas celulares en las que se había observado mayor o menor sensibilidad a TRAIL, incubando con ambas formulaciones del ligando mortal. Además y en paralelo, se analizó la muerte celular inducida tanto por sTRAIL como por LUV-TRAIL analizando mediante citometría de flujo el porcentaje de células anexina-V positivas. Los resultados del ensayo se muestran en la Figura 4.4.

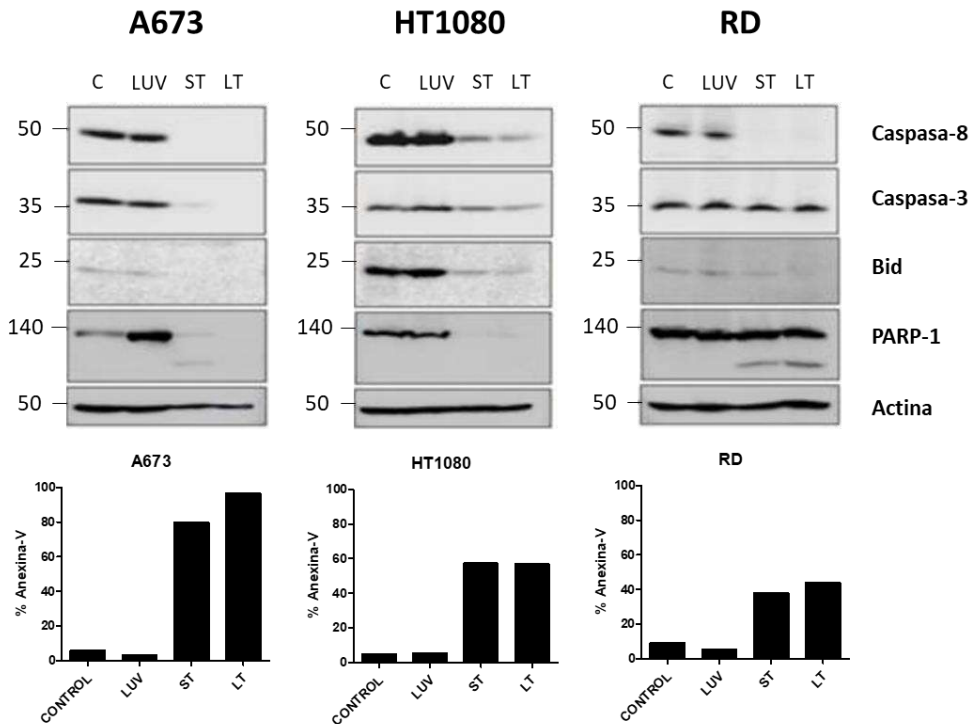


Figura 4.4 Análisis de la activación de caspasas en líneas celulares de sarcoma. Las líneas celulares A673, HT1080 y RD fueron tratadas con liposomas desnudos (LUV), sTRAIL (ST) y LUV-TRAIL (LT) a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ durante una incubación de 24 horas. Células no tratadas se utilizaron como control (C). Tras la incubación, se procedió al lisado celular y análisis mediante *Western blot*. Los niveles de muerte celular se midieron por citometría de flujo.

En la línea celular A673 se observó un procesamiento casi completo de todas las proteínas estudiadas implicadas en la cascada apoptótica cuando se trató con sTRAIL, alcanzando una muerte celular del 80%. LUV-TRAIL fueron capaces de activar totalmente la apoptosis, llegando a un 100% de células anexina-V positivas. Por el contrario, en las células HT1080 el tratamiento con sTRAIL y LUV-TRAIL generó una activación parcial de las caspasas-8 y -3, así

como de la proteína Bid. Aunque esto se tradujo en un elevado procesamiento de PARP-1, los niveles de muerte celular no superaron el 60% para el tratamiento con ambas formulaciones de TRAIL. La línea celular RD presentó tras el tratamiento con las dos formulaciones de TRAIL una potente activación de la caspasa-8 y Bid, que sin embargo no se observó en la caspasa-3. Respecto a PARP-1, el procesamiento que se observó fue parcial, aunque ligeramente superior para LUV-TRAIL. En las células RD, la muerte celular fue del 50% aproximadamente para las dos formulaciones de TRAIL.

El experimento de análisis de la activación de las proteínas apoptóticas refleja que, aunque inicialmente se evidenció un mayor potencial citotóxico en la formulación LUV-TRAIL frente a la forma soluble del ligando, en este ensayo no se observaron diferencias significativas en los niveles de procesamiento y activación de caspasas para ambas formas de TRAIL en las células HT1080 y RD. En el caso de las células A673 sí se observó una activación de la ruta más eficiente para la formulación LUV-TRAIL.

Finalmente, se estudió la cinética en el proceso de apoptosis tras el tratamiento con sTRAIL y LUV-TRAIL sobre las líneas celulares de sarcoma sensibles a TRAIL. Para ello, se realizó un ensayo analizando a distintos tiempos tanto la expresión de las proteínas implicadas en la apoptosis mediante *Western blot* como el porcentaje de células anexina-V positivas mediante citometría de flujo. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 4.5.

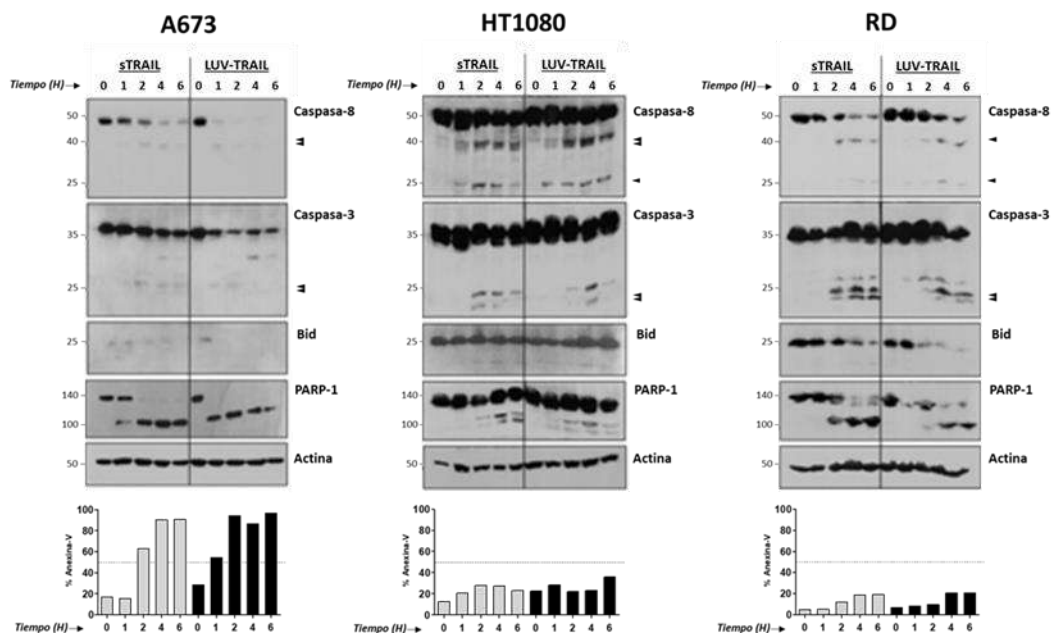


Figura 4.5 Análisis temporal de la activación de las proteínas implicadas en la apoptosis en líneas celulares de sarcoma tras el tratamiento con TRAIL. Las líneas celulares A673, HT1080 y RD se trataron con sTRAIL y LUV-TRAIL a la dosis de 1 $\mu\text{g/ml}$ a diferentes tiempos (0-6 horas). Al tiempo final, las células se recolectaron y lisaron. Los lisados se analizaron mediante *Western blot*, mientras que la muerte celular se midió por citometría de flujo.

El ensayo muestra como el tratamiento de las células A673 con sTRAIL activó las diferentes proteínas de la cascada apoptótica de forma gradual, mientras que LUV-TRAIL generó un fuerte procesamiento de todas las proteínas ya a la primera hora de tratamiento, manteniéndose hasta el tiempo final. En el caso de las células HT1080 y RD, se observó que la activación de las caspasas se inicia tras 2 horas de tratamiento, manteniéndose sin apenas variaciones hasta el tiempo final. Además no se observaron diferencias significativas entre sTRAIL y LUV-TRAIL. En este sentido, hay que tener en cuenta que los bajos valores de muerte celular obtenidos en este experimento a los tiempos analizados en las células HT1080 y RD ha podido influenciar en la detección de las diferencias en la cinética entre sTRAIL y LUV-TRAIL.

Finalmente, estos datos reflejan que LUV-TRAIL no producen, al menos a tiempos cortos, una activación de la apoptosis mucho más rápida que sTRAIL en células de sarcoma sensibles a la citotoxicidad de TRAIL, a excepción de la línea

celular A673, donde la velocidad de activación de la ruta apoptótica fue mayor para LUV-TRAIL en comparación con la forma soluble de la proteína. Además, observando los resultados de la Figura 4.4, se puede concluir que la formulación LUV-TRAIL requiere tiempos más allá de 6 horas para la completa activación y ejecución de la ruta apoptótica en determinadas líneas celulares de sarcoma, como son las células HT1080 y RD.

4.1.2 Estudio de la muerte celular inmunogénica inducida por TRAIL sobre líneas celulares tumorales de sarcoma

Los diferentes tipos de terapias anti-tumorales tienen el objetivo de inducir muerte celular sobre las células transformadas, lo que puede llevarse a cabo mediante diversos mecanismos. Cuando la apoptosis inducida está asociada a la liberación de patrones moleculares asociados a peligro (DAMP del inglés, *Damage-Associated Molecular Patterns*), se activan componentes del sistema inmune innato y adaptativo [369] y se genera con ello una óptima reacción anti-tumoral del sistema inmune. Este tipo específico de apoptosis se denomina muerte celular inmunogénica y está orquestada por el reconocimiento de los DAMPs presentes en el microambiente tumoral por parte de células dendríticas [370, 371]. La calreticulina es una proteína chaperona del retículo endoplásmico que forma parte de los DAMPs, cuya traslocación a la cara externa de la membrana plasmática durante la apoptosis es determinante para la inducción de muerte celular inmunogénica [372, 373]. Aunque existen otras moléculas que constituyen señales DAMPs en el proceso de apoptosis, diversos estudios determinan que los niveles de calreticulina en el microambiente tumoral suponen un útil biomarcador de pronóstico frente la respuesta inmune de un tratamiento anti-tumoral, constituyendo una prometedora herramienta clínica para el tratamiento de tumores sólidos y hematológicos [374-377].

Los agentes anti-tumorales con capacidad de generar inmunogenicidad a través de la inducción de apoptosis son de gran interés para el estudio de nuevos enfoques de tratamiento. Es por ello que en el presente trabajo se quiso comprobar la capacidad de TRAIL para inducir muerte celular inmunogénica en

células tumorales de sarcoma. Para ello, el análisis se llevó a cabo monitorizando los niveles de calreticulina presentes en las células HT1080 a diferentes tiempos tras el tratamiento con TRAIL soluble y LUV-TRAIL. Las células se examinaron seleccionando la población 7-AAD negativa mediante citometría de flujo y analizando el porcentaje de células con exposición de calreticulina en la superficie celular. Para validar la metodología, se incluyeron un control positivo (bortezomib) y negativo (mitomicina C) de muerte celular inmunogénica [378], así como liposomas con ausencia de TRAIL en su superficie. Los resultados se representan en la Figura 4.6.

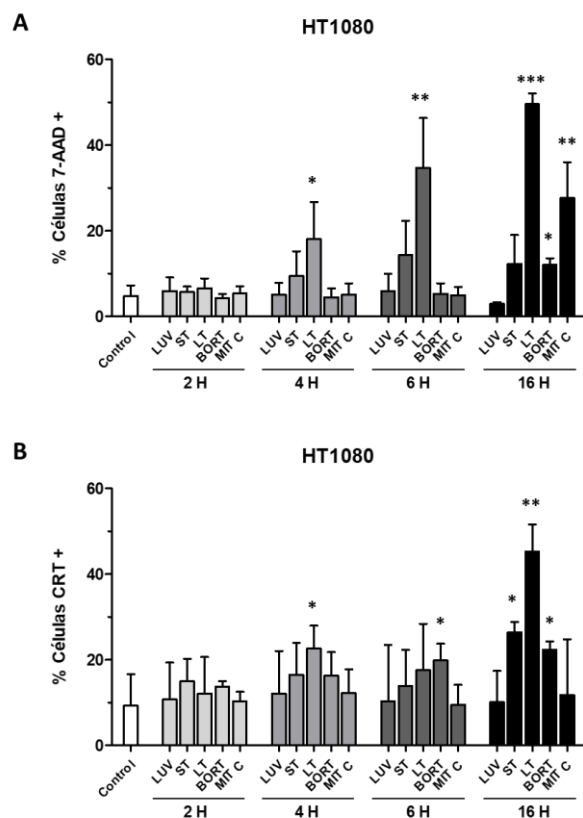


Figura 4.6 Análisis de la muerte celular inmunogénica inducida por TRAIL mediante la detección de calreticulina traslocada a la superficie de membrana en células HT1080. Las células se incubaron con TRAIL soluble (ST, 1 μ g/ml), LUV-TRAIL (LT, 1 μ g/ml), bortezomib (BORT, 60 nM) y mitomicina C (MIT C, 60 μ g/ml) durante periodos de 2, 4, 6 y 16 horas. Células sin tratar (control) y células tratadas con liposomas a una concentración equivalente a LUV-TRAIL (LUV) se incluyeron como control del experimento. Tras el tratamiento, se analizó por citometría de flujo la muerte celular mediante marcaje con 7-AAD (A) y la exposición de calreticulina en la superficie celular en la población 7-AAD negativa (B). Las gráficas muestran la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes (* p <0,05, ** p <0,005, *** p <0,001, \pm 95%CI).

La muerte celular inducida por TRAIL durante el experimento comenzó a detectarse a las 4 horas, siendo especialmente significativa la citotoxicidad de LUV-TRAIL y obteniendo unos valores del 50% de células 7-AAD positivas a las 16 horas de incubación. En el caso de TRAIL soluble, aunque hubo un incremento de la muerte celular, no llegó a alcanzar valores significativos con respecto al control. La muerte celular inducida por los fármacos bortezomib y mitomicina C se detectó a las 16 horas, alcanzando unos porcentajes del 15% y 30% de células 7-AAD positivas.

El análisis de la exposición de calreticulina en la superficie celular se llevó a cabo sobre la población de células 7-AAD negativas. Se estableció este criterio para asegurar un marcaje superficial, ya que son las células que poseen la membrana plasmática íntegra, evitando así interferencias con la calreticulina intracelular. En la Figura 4.6 (B) se observa cómo se produjo un incremento de células que expresan calreticulina en la membrana cuando se trataron con TRAIL a las 4 horas de incubación, siendo mayor el efecto de LUV-TRAIL frente a la proteína soluble. Estos niveles no experimentaron cambios durante el periodo de 6 horas de tratamiento, sin embargo, se produjo un incremento significativo a las 16 horas de incubación con TRAIL, alcanzando unos porcentajes de células positivas para calreticulina del 30% para TRAIL soluble y 50% en el caso de LUV-TRAIL. Además, el tratamiento con LUV sin TRAIL en su superficie no presentó ninguna variación en la traslocación de calreticulina con respecto al control. Por otro lado, bortezomib, un compuesto que ha demostrado inducir muerte celular inmunogénica en estudios anteriores [379], se incluyó en el experimento como control positivo indicativo de un procedimiento metodológico correcto. Bortezomib indujo valores significativos de calreticulina a las 6 horas de incubación alcanzando un porcentaje del 25% de células calreticulina positivas en el tiempo máximo de tratamiento. Así mismo, la incubación con mitomicina C, incluida en el experimento como control negativo, no presentó variaciones de calreticulina en la superficie de las células a lo largo del tiempo.

Los resultados obtenidos en la Figura 4.6 permiten concluir que la incubación de células HT1080 con TRAIL induce una apoptosis acompañada con

la exposición de calreticulina al exterior celular. Este efecto es potenciado cuando el ligando mortal está anclado a la superficie de liposomas, siendo TRAIL y no la presencia de liposomas el responsable del efecto. Esto indica que tanto TRAIL soluble como sobre todo LUV-TRAIL son capaces de inducir una muerte celular inmunogénica en el proceso de apoptosis, lo que podría conferir mayor relevancia como posible tratamiento anti-tumoral.

4.2 Tratamiento combinado de TRAIL con agentes sensibilizantes

La caracterización inicial de las líneas celulares de sarcoma ante el efecto del tratamiento con TRAIL nos permite clasificar las células estudiadas en dos grandes grupos: células sensibles a la apoptosis inducida por TRAIL (A673, HT1080 y RD) y células resistentes a la citotoxicidad inducida por TRAIL (RH4 y CADO-ES). Para ambos grupos, se realizó un análisis del empleo combinado de TRAIL con agentes sensibilizantes clave para observar si es posible mejorar el potencial citotóxico de TRAIL (soluble o asociado a liposomas) o incluso superar la resistencia a la muerte celular en líneas celulares resistentes a este ligando mortal.

En la literatura científica se han descrito numerosos compuestos capaces de actuar sinérgicamente con TRAIL en tratamientos combinados, es por ello que seleccionamos de todos ellos cinco moléculas que actúan en sinergia con TRAIL por diversos mecanismos para ser testadas en combinación tanto con TRAIL soluble como con LUV-TRAIL.

Las moléculas flavopiridol y SNS-032 son inhibidores pan-CDK, quinasas cuyo bloqueo inhibe la síntesis de RNA afectando a la producción proteica y facilitando así la inducción de apoptosis en determinadas líneas celulares [263, 308, 309]. Esta apoptosis también se puede inducir mediante la inhibición del proteasoma con fármacos como bortezomib [206]. Flavopiridol, SNS-032 y bortezomib fueron seleccionados debido a su fuerte sinergia con TRAIL soluble descrita previamente en la literatura [201, 206, 308]. También se quiso estudiar el efecto de TRAIL con moléculas intercalantes del DNA como la doxorrubicina [331,

380], fármaco quimioterápico ampliamente utilizado en numerosos tipos tumorales, así como la trabectedina [342, 343], molécula utilizada recientemente y con buenos resultados para el tratamiento de sarcomas de partes blandas.

4.2.1 Estudio del efecto combinatorio de TRAIL con agentes sensibilizantes en líneas celulares de sarcoma resistentes a TRAIL

El estudio de la posible sensibilización de células resistentes a TRAIL con diferentes fármacos requiere un análisis inicial del efecto citotóxico de los compuestos de forma individualizada. El estudio de la citotoxicidad del compuesto a diferentes dosis permite seleccionar una concentración óptima para realizar luego el tratamiento en combinación con sTRAIL y LUV-TRAIL. La dosis escogida será la que se ha denominado dosis sub-tóxica, en la que la muerte celular producida por el agente sensibilizante es menor del 20%, lo que permite observar posteriormente en la combinación con TRAIL si efectivamente hay un efecto sensibilizador a la muerte inducida por TRAIL y no una adición de las muertes inducidas por el ligando mortal y el agente.

Para la detección de la dosis sub-tóxica de los cinco fármacos seleccionados, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular mediante la técnica MTT (Figura 4.7). Posteriormente, con el objetivo de corroborar que la muerte celular a la dosis seleccionada para cada fármaco no supera el 20% de muerte celular (con respecto a los niveles basales), se realizó el mismo experimento dosis-respuesta analizando los datos mediante citometría de flujo, con un marcaje de anexina-V (Figura 4.8).

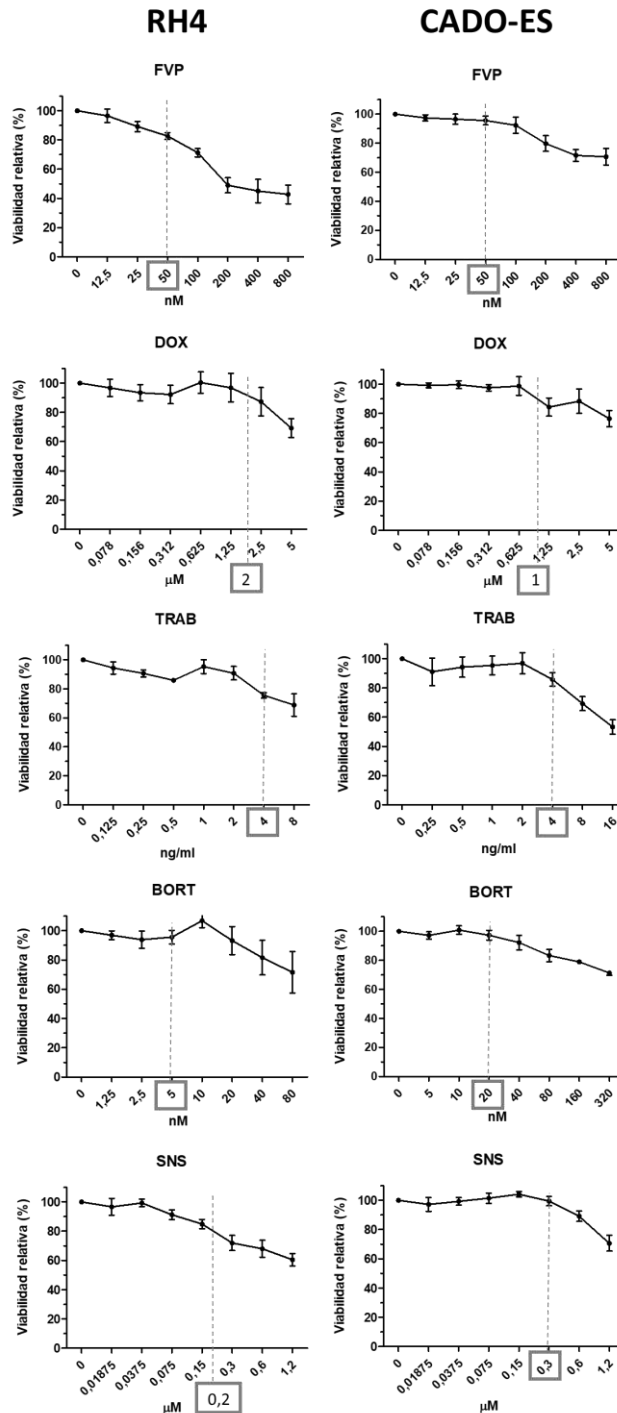


Figura 4.7 Ensayo dosis-respuesta de los fármacos sensibilizantes en células de sarcoma resistentes a TRAIL. Las líneas celulares RH4 y CADO-ES se trataron con diferentes concentraciones de flavopiridol (FVP), doxorrubicina (DOX), trabectedina (TRAB), bortezomib (BORT) y SNS-032 (SNS) durante 24 horas. El ensayo se analizó mediante MTT. Las gráficas muestran la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes.

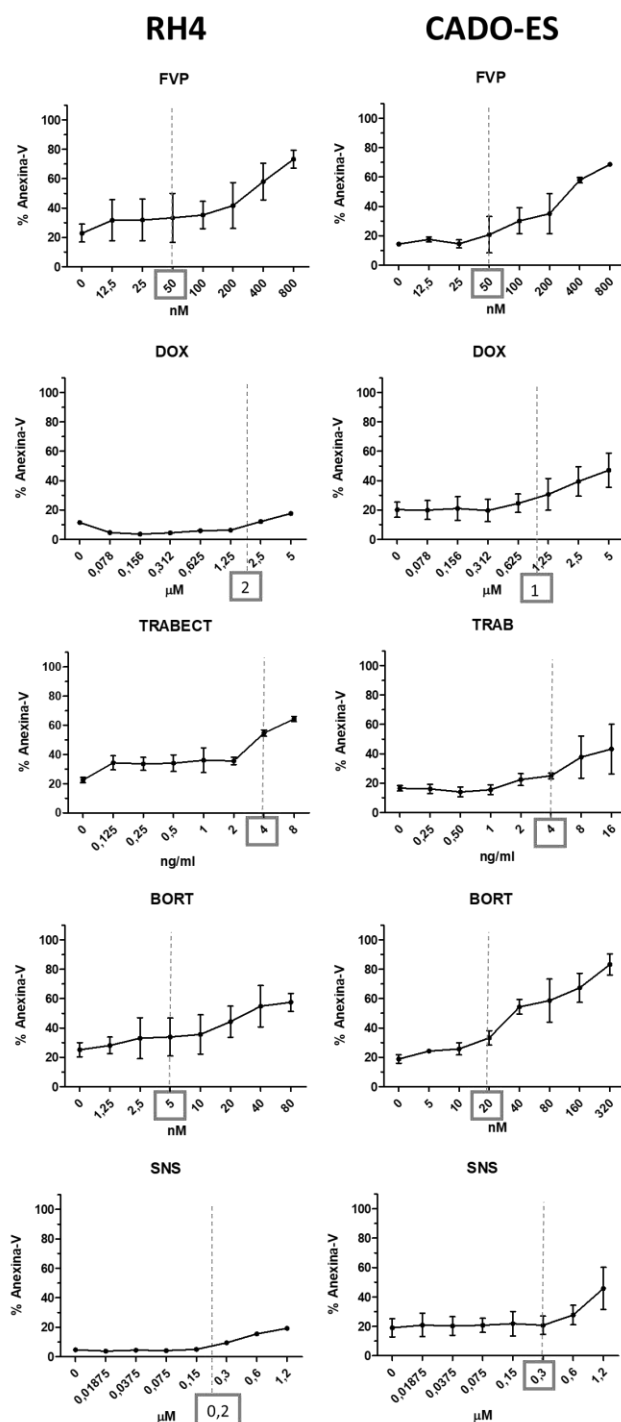


Figura 4.8 Ensayo dosis-respuesta de los fármacos sensibilizantes en células de sarcoma resistentes a TRAIL. Las líneas celulares RH4 y CADO-ES se trataron con diferentes concentraciones de flavopiridol (FVP), doxorubicina (DOX), trabectedina (TRAB), bortezomib (BORT) y SNS-032 (SNS) durante 24 horas. El ensayo se analizó mediante citometría de flujo. Las gráficas muestran la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes.

Las concentraciones sub-tóxicas seleccionadas para las células RH4 fueron las siguientes: flavopiridol 50 nM, doxorubicina 2 μ M, trabectedina 4 ng/ml, bortezomib 5 nM y SNS-032 0,2 μ M. Por otro lado, las concentraciones correspondientes a las células CADO-ES fueron: flavopiridol 50 nM, doxorubicina 1 μ M, trabectedina 4 ng/ml, bortezomib 20 nM y SNS-032 0,3 μ M.

El estudio del efecto combinatorio en las células pre-tratadas con los agentes sensibilizantes a las dosis sub-tóxicas fijadas con sTRAIL y LUV-TRAIL se muestra en la Figura 4.9. En el análisis se puede observar que no hubo una reducción significativa en la viabilidad relativa tras el tratamiento combinado con los diferentes fármacos seleccionados. Con estos datos, se puede concluir que el uso de los compuestos potencialmente sensibilizantes a TRAIL no tiene efectos en la mejora significativa de la capacidad citotóxica de sTRAIL y LUV-TRAIL en las células RH4 y CADO-ES, permaneciendo ambos tipos celulares resistentes a la apoptosis inducida por TRAIL para las dos formulaciones estudiadas.

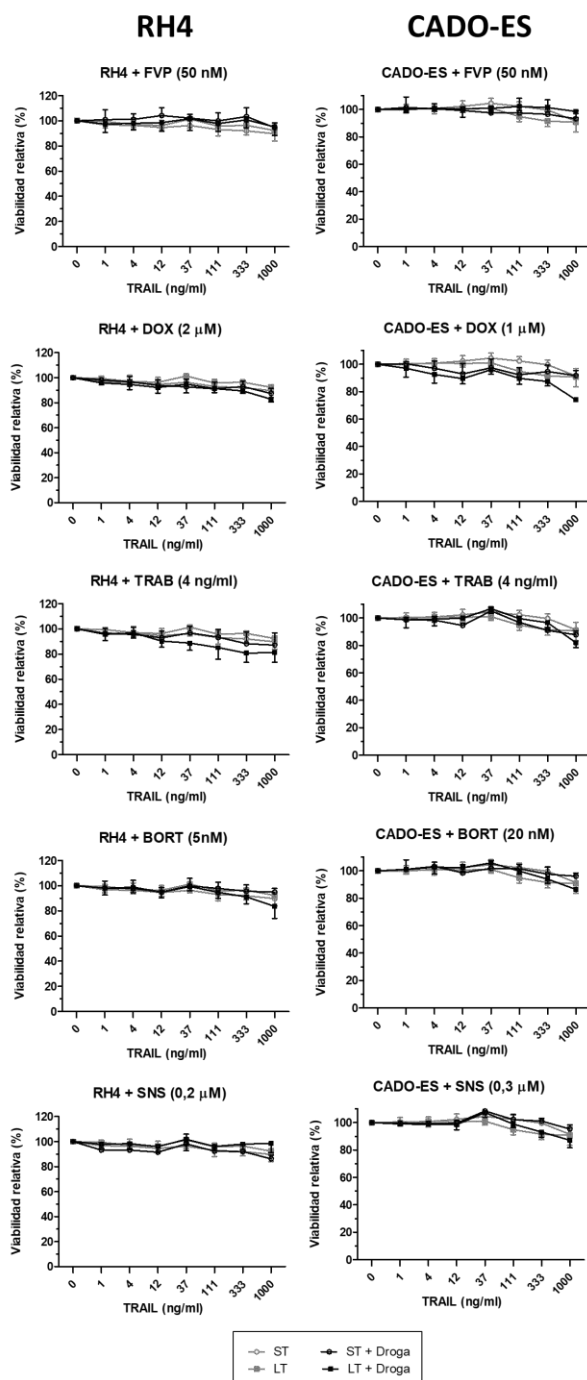


Figura 4.9 Análisis del efecto citotóxico de sTRAIL y LUV-TRAIL en células de sarcoma resistentes a TRAIL tras un pre-tratamiento con agentes sensibilizantes. Las células RH4 y CADO-ES fueron pre-incubadas con flavopiridol (FVP), doxorrubicina (DOX), trabectedina (TRAB), bortezomib (BORT) y SNS-032 (SNS) durante un mínimo de 2 horas. Finalizada la pre-incubación se añadió sTRAIL (ST) y LUV-TRAIL (LT) a una dosis de 1 μ g/ml. Las células permanecieron un periodo de 24 horas de tratamiento, tras el cual se analizó la viabilidad celular por MTT. Las gráficas muestran la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes.

4.2.2 Estudio del efecto combinatorio de TRAIL con agentes sensibilizantes en líneas celulares de sarcoma sensibles a TRAIL

El mismo procedimiento llevado a cabo en el apartado anterior se realizó sobre las líneas celulares A673, HT1080 y RD, todas ellas sensibles en mayor o menor medida a la apoptosis inducida por TRAIL.

Se ha comprobado con anterioridad que la formulación LUV-TRAIL presenta un aumento en la capacidad citotóxica con respecto a la forma soluble de la proteína en células de sarcoma (excepto en la línea celular A673 que presenta una sensibilidad muy elevada a ambas formulaciones). Sin embargo, en las líneas celulares HT1080 y RD aunque LUV-TRAIL fueron más citotóxicos que TRAIL soluble, la muerte celular inducida por los liposomas fue aproximadamente de un 50%, por lo que se quiso aumentar la citotoxicidad, fundamentalmente de LUV-TRAIL, mediante el uso combinado con los agentes sensibilizantes seleccionados. Para ello, inicialmente se analizó el efecto de los agentes individualmente y se determinó la concentración sub-tóxica a la que trabajar posteriormente en combinación con TRAIL. El análisis se llevó a cabo mediante MTT (Figura 4.10) y marcaje con anexina-V (Figura 4.11), tal y como se ha descrito en el apartado anterior.

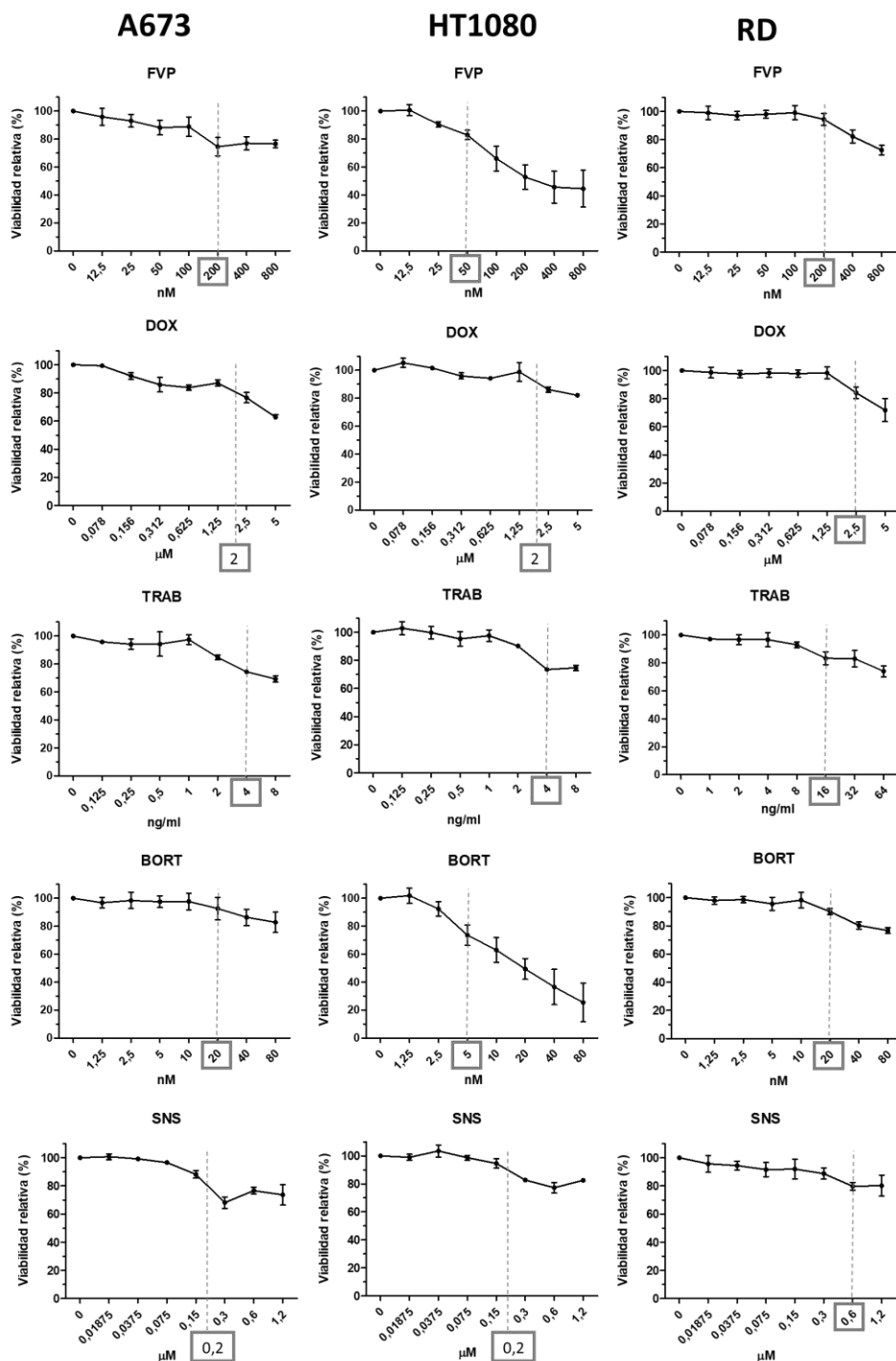


Figura 4.10 Ensayo dosis-respuesta de los fármacos sensibilizantes en células de sarcoma sensibles a TRAIL. Las líneas celulares A673, HT1080 y RD se trataron con diferentes concentraciones de flavopiridol (FVP), doxorubicina (DOX), trabectedina (TRAB), bortezomib (BORT) y SNS-032 (SNS) durante 24 horas. El ensayo se analizó mediante MTT. Las gráficas muestran la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes.

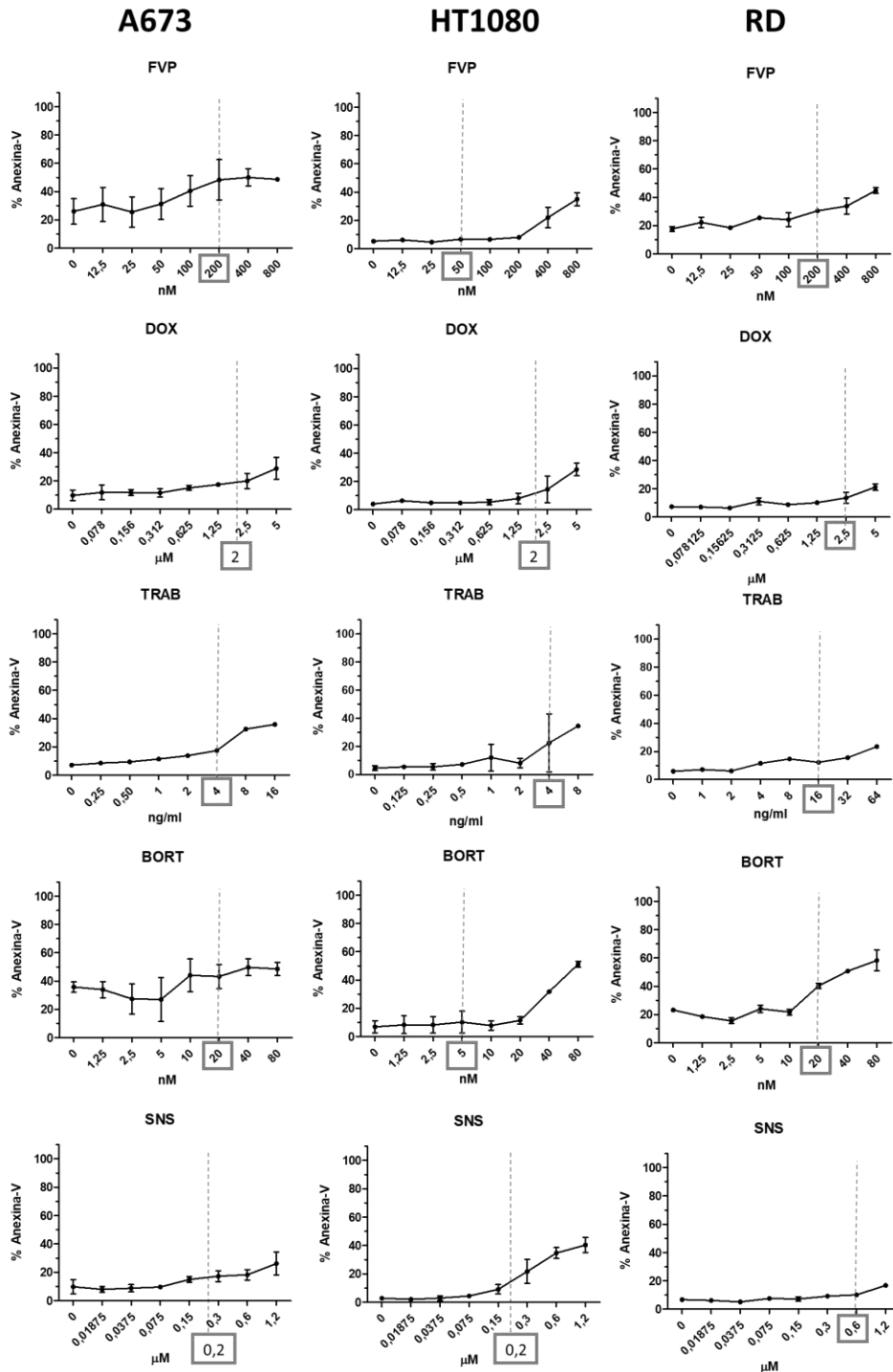


Figura 4.11 Ensayo dosis-respuesta de los fármacos sensibilizantes en células de sarcoma sensibles a TRAIL. Las líneas celulares A673, HT1080 y RD se trataron con diferentes concentraciones de flavopiridol (FVP), doxorubicina (DOX), trabectedina (TRAB), bortezomib (BORT) y SNS-032 (SNS) durante 24 horas. El ensayo se analizó mediante citometría de flujo. Las gráficas muestran la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes.

Las concentraciones sub-tóxicas determinadas para los diferentes fármacos en la línea celular A673 fueron: flavopiridol 200 nM, doxorrubicina 2 μ M, trabectedina 4 ng/ml, bortezomib 20 nM y SNS-032 0,2 μ M. A su vez, las concentraciones correspondientes a las células HT1080 fueron: flavopiridol 50 nM, doxorrubicina 2 μ M, trabectedina 4 ng/ml, bortezomib 5 nM y SNS-032 0,2 μ M. Finalmente, para la línea celular RD se escogieron las siguientes concentraciones sub-tóxicas: flavopiridol 200 nM, doxorrubicina 2,5 μ M, trabectedina 16 ng/ml, bortezomib 20 nM y SNS-032 0,6 μ M.

El tratamiento combinado, al igual que en el apartado anterior, consistió en pre-incubar las diferentes líneas celulares con los agentes sensibilizantes a las concentraciones seleccionadas, y tras 2 horas, añadir TRAIL (sTRAIL o LUV-TRAIL) a una concentración de 1 μ g/ml. Los resultados de viabilidad celular, analizados mediante la técnica MTT se exponen en la Figura 4.12.

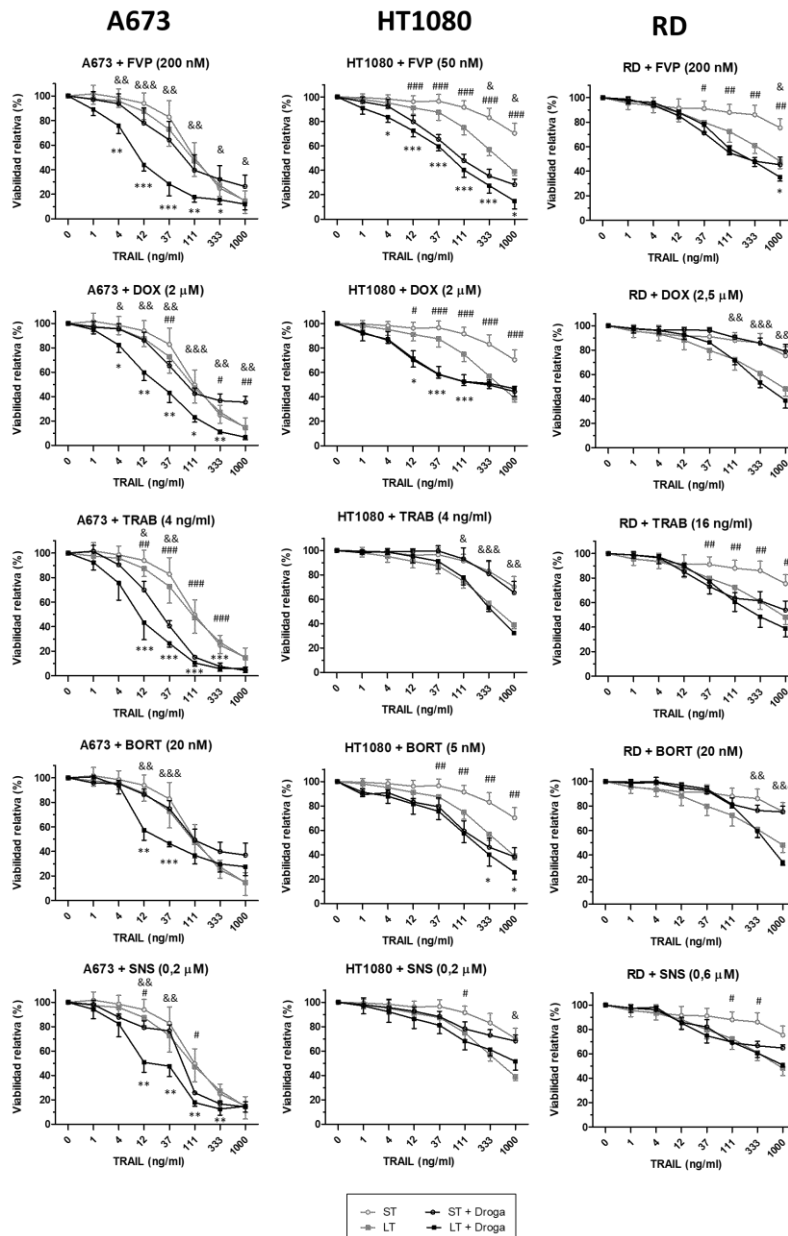


Figura 4.12 Análisis del efecto citotóxico de sTRAIL y LUV-TRAIL en células de sarcoma sensibles a TRAIL tras un pre-tratamiento con agentes sensibilizantes. Las células A673, HT1080 y RD fueron pre-incubadas con flavopiridol (FVP), doxorrubicina (DOX), trabectedina (TRAB), bortezomib (BORT) y SNS-032 (SNS) durante un mínimo de 2 horas. Finalizada la pre-incubación se añadió sTRAIL (ST) y LUV-TRAIL (LT) a una dosis de 1 µg/ml. Las células permanecieron un periodo de 24 horas de tratamiento, tras el cual se analizó la viabilidad celular por MTT. Las gráficas muestran la media±SD de al menos tres experimentos independientes. El signo asterisco indica la significación entre LT sólo y LT combinado con la correspondiente droga (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, $\pm 95\%CI$). El signo almohadilla indica la significación entre ST sólo y ST combinado con la correspondiente droga (# $p < 0,05$, ## $p < 0,005$, ### $p < 0,001$, $\pm 95\%CI$). El signo et indica la significación entre ST y LT ambos combinados con la correspondiente droga (& $p < 0,05$, && $p < 0,005$, &&& $p < 0,001$, $\pm 95\%CI$).

La combinación con flavopiridol en la línea celular A673, altamente sensible a TRAIL, no mejoró la capacidad citotóxica de ninguna de las dos formulaciones de TRAIL a la dosis más alta empleada en el experimento (1 µg/ml), aunque sí mejoró la citotoxicidad de LUV-TRAIL de forma significativa a las dosis intermedias empleadas, algo que no se observó con sTRAIL.

En el caso de las células HT1080, se observó una sensibilización con flavopiridol muy significativa para ambas formulaciones en todas las dosis empleadas, llegando a reducir la viabilidad un 70% en el caso de sTRAIL y más de un 80% LUV-TRAIL. En esta línea celular, el tratamiento con el agente sensibilizante flavopiridol no sólo mejoró muy significativamente el potencial citotóxico de ambas formas de TRAIL, sino que los equiparó, observándose un efecto similar para todas las concentraciones salvo a las dosis altas, donde la capacidad citotóxica de LUV-TRAIL en combinación con flavopiridol fue significativamente mayor que TRAIL soluble en combinación con flavopiridol.

Las células RD tratadas con flavopiridol presentaron una sensibilización muy pronunciada cuando se combinó con sTRAIL, alcanzando un descenso de viabilidad de un 50%, mientras que para LUV-TRAIL sólo se observó a la dosis máxima, sin alcanzar una elevada significación. Además, como ocurre en la línea celular HT1080 con el mismo tratamiento, no se observaron diferencias significativas en el efecto citotóxico de ambas formulaciones cuando se combinaron con flavopiridol, salvo a la dosis máxima, donde LUV-TRAIL presentó una citotoxicidad ligeramente más elevada.

La doxorrubicina combinada con TRAIL, en la línea celular A673, tuvo un efecto similar al tratamiento con flavopiridol, observándose sólo una sensibilización en el caso de LUV-TRAIL a dosis intermedias. Además disminuyó de forma significativa la capacidad citotóxica de sTRAIL en la concentración máxima estudiada. En la línea celular HT1080, la combinación de doxorrubicina con sTRAIL produjo una sensibilización muy significativa, alcanzando los mismos niveles de toxicidad que la combinación de LUV-TRAIL con doxorrubicina en la que se observó una sensibilización a las dosis intermedias de LUV-TRAIL

empleadas. En ninguna de las dos combinaciones de TRAIL (sTRAIL y LUV-TRAIL) con doxorrubicina en las células HT1080 se llegó a superar los valores de muerte celular inducidos por LUV-TRAIL sin doxorrubicina a la dosis máxima. Finalmente, la doxorrubicina no presentó ningún efecto sensibilizante en el tratamiento combinado con TRAIL sobre las células RD.

La combinación con el agente sensibilizante trabectedina incrementó significativamente el potencial citotóxico de ambas formulaciones de TRAIL en la línea celular A673, llegando a ser la citotoxicidad del tratamiento combinado con LUV-TRAIL a dosis intermedias significativamente mayor comparado con la combinación con sTRAIL. En las células HT1080, no se observó ningún tipo de efecto sensibilizador en el tratamiento combinado con la trabectedina. Por otro lado, el tratamiento con trabectedina en la línea celular RD sólo sensibilizó a las células cuando se combinó con sTRAIL, obteniendo unos valores de citotoxicidad similares al tratamiento con LUV-TRAIL.

El compuesto bortezomib en la línea celular A673, al igual que otros agentes sensibilizantes estudiados, fundamentalmente sensibilizó a LUV-TRAIL cuando se combinaron a las dosis intermedias de éstos. Además, en este caso el tratamiento combinado generó una ligera pérdida de potencial citotóxico a dosis altas para las dos formas de TRAIL analizadas. Por otro lado, en la línea celular HT1080 el tratamiento combinado con bortezomib incrementó principalmente la capacidad citotóxica de sTRAIL, llegando a ser equiparables los efectos de ambas formulaciones cuando están en combinación con bortezomib, sólo observándose diferencias ligeramente significativas a dosis altas. Finalmente, en las células RD no se observó ninguna sensibilización cuando se empleó el agente bortezomib junto con ambas formulaciones de TRAIL.

En las células A673 tratadas con la combinación de TRAIL y SNS-032, nuevamente LUV-TRAIL presentó un incremento en la citotoxicidad en la combinación con las dosis intermedias, pero no con la dosis máxima. En cuanto a sTRAIL, a pesar de que se observó una mejora significativa de la citotoxicidad con concentraciones concretas (12 y 111 ng/ml), la curva dosis-respuesta de sTRAIL

en combinación con SNS-032 resultó similar a la de sTRAIL solo. Algo similar ocurrió en la combinación de TRAIL soluble con SNS-032 en las células HT1080. El compuesto mejoró la capacidad citotóxica únicamente de sTRAIL a la concentración de 111 ng/ml, permaneciendo el resto de valores de la curva dosis-respuesta sin diferencias significativas con respecto a los valores de citotoxicidad de sTRAIL solo. En el caso de LUV-TRAIL, la combinación con SNS-032 no mejoró su acción citotóxica en las células HT1080. Finalmente, en las células RD el tratamiento combinado de TRAIL y SNS-032 consiguió una sensibilización significativa en la combinación con sTRAIL, fundamentalmente a dosis intermedias, sin observarse cambios en la capacidad citotóxica de LUV-TRAIL cuando se emplearon solos o en combinación con SNS-032.

4.2.3 Estudio de los mecanismos de acción de los agentes sensibilizantes a la apoptosis inducida por TRAIL

El efecto sensibilizante al potencial citotóxico de TRAIL varía, como se ha visto en el apartado anterior, en función tanto del agente sensibilizante empleado como del tipo celular analizado. Pero además, la variabilidad observada puede deberse a los diferentes mecanismos de acción de cada compuesto implicados en la sensibilización a la muerte inducida por TRAIL. Es por ello que se quiso estudiar con mayor profundidad los mecanismos inducidos por los agentes sensibilizantes cuando se administran a las diferentes líneas celulares, A673, HT1080 y RD, con diferente sensibilidad a la muerte inducida por TRAIL. Para ello, el presente trabajo se ha centrado en el estudio de los niveles de los diferentes receptores del ligando mortal presentes en la superficie celular así como en el análisis de la variación de la expresión de las principales proteínas implicadas en la ruta apoptótica tras el tratamiento con el agente sensibilizante.

El análisis de los mecanismos de sensibilización se llevó a cabo con los compuestos flavopiridol, doxorrubicina y trabectedina. Estos compuestos fueron seleccionados ya que son las moléculas que han dado mejores resultados de sensibilización en el tratamiento en combinación con TRAIL.

4.2.3.1 Estudio del mecanismo de acción de flavopiridol

El cambio en los niveles de expresión de los diferentes receptores mortales específicos puede constituir un mecanismo por el que aumente o disminuya la capacidad citotóxica de un ligando mortal como TRAIL. Es por ello que determinar los cambios en los niveles de receptores a nivel de superficie celular tras el tratamiento con un compuesto sensibilizante puede ser útil a la hora de dilucidar su mecanismo de acción.

Por ello, se diseñó un experimento con el objetivo de detectar las variaciones en la superficie celular de la cantidad de los diferentes receptores de TRAIL inducidas por el tratamiento con flavopiridol. Las células A673, HT1080 y RD se sometieron a una incubación durante 6 horas sin y con flavopiridol a las concentraciones sub-tóxicas empleadas en los ensayos combinados con TRAIL. Tras finalizar el tiempo de incubación, se analizaron los 4 receptores de TRAIL (DR4, DR5, DcR1 y DcR2) mediante citometría de flujo empleando anticuerpos específicos. Los resultados se muestran en la Figura 4.13.

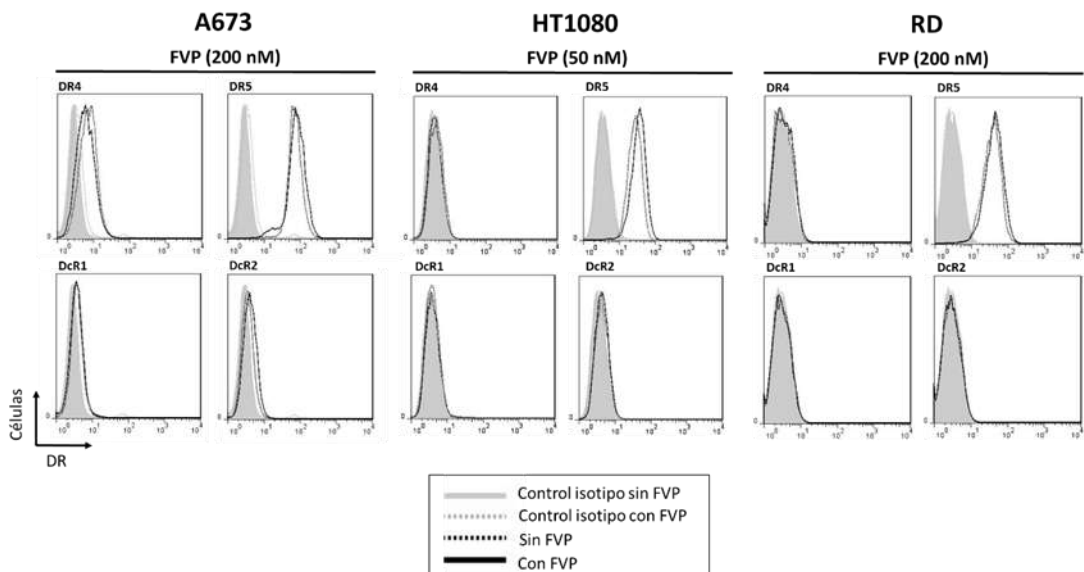


Figura 4.13 Expresión de receptores de TRAIL en la superficie celular tras el tratamiento con FVP en las células A673, HT1080 y RD. Las células se incubaron sin y con flavopiridol (FVP) a una concentración de 200 nM (A673 y RD) o 50 nM (HT1080) durante 6 horas. Finalizado el tiempo, las células se lavaron con PBS y se marcaron con anticuerpos de citometría para los diferentes receptores de TRAIL.

Las células A673 apenas presentaron variación en la expresión en superficie de los receptores de TRAIL cuando fueron incubadas con flavopiridol salvo un ligero aumento de la expresión del receptor pro-apoptótico DR5 y el receptor señuelo DcR2. Sin embargo, dado que el desplazamiento del pico de expresión observado en ambos casos fue mínimo, es muy probablemente que no se tradujera en variaciones reales en los niveles de receptores DR5 y DcR2 en la superficie de las células A673. Lo mismo se observó con el receptor DR5 en las células HT1080, cuya expresión aumentó ligeramente tras el tratamiento con flavopiridol. En las células RD se observó claramente que los niveles de expresión se mantuvieron constantes, sin que flavopiridol afectara a la expresión de los receptores tras 6 horas de incubación.

Tras el análisis de la expresión superficial de los receptores de TRAIL mostrado en la Figura 4.13, podemos concluir que la molécula flavopiridol no tiene efecto claramente significativo sobre los niveles de expresión en superficie de los diferentes receptores mortales de TRAIL, lo que sugiere que su efecto sensibilizante a la muerte inducida por TRAIL no se debe, al menos en las líneas de sarcoma analizadas, a un aumento de la expresión de los receptores pro-apoptóticos de TRAIL o a una disminución en la expresión de los receptores señuelo.

El siguiente ensayo realizado dentro de la caracterización de los mecanismos de sensibilización del flavopiridol fue el análisis de la expresión de las principales proteínas implicadas en la cascada apoptótica. Para ello, las células se incubaron a diferentes concentraciones de flavopiridol durante un periodo de 6 horas. Posteriormente, las células se lisaron y se realizó un análisis mediante *Western blot*. Además y en paralelo, se realizó un marcaje con anexina-V de todos los puntos experimentales estudiados para comprobar que el tratamiento con las distintas dosis de flavopiridol empleadas no ejercían *per se* muerte celular, pudiendo asumir de esta manera que los posibles efectos observados contribuyen al efecto sensibilizante de flavopiridol. Los resultados se muestran en la Figura 4.14.

En las células A673, flavopiridol produjo un descenso de la proteína anti-apoptótica cFLIP (en sus dos isoformas) claramente visible a las dosis más elevadas, así como un descenso de XIAP de una forma dosis-dependiente, llegando a desaparecer a la concentración estudiada en los ensayos de combinación con TRAIL (200 nM).

Sin embargo, el tratamiento con flavopiridol en las células HT1080 y RD tuvo efectos distintos. En ambas líneas celulares se observó un descenso en cFLIP, pero exclusivamente en la isoforma corta, a partir de la concentración de 50 nM y 200 nM respectivamente. Cabe señalar además un descenso en los niveles de la pro-caspasa-8 en las células RD cuando se trataron con flavopiridol a concentraciones altas. Sin embargo, este hecho podría responder a la activación de la caspasa-8 debido a la citotoxicidad del compuesto a dichas concentraciones, que se reflejó en las células anexina-V positivas, alcanzando un 35% de muerte celular a la concentración de 500 nM de flavopiridol.

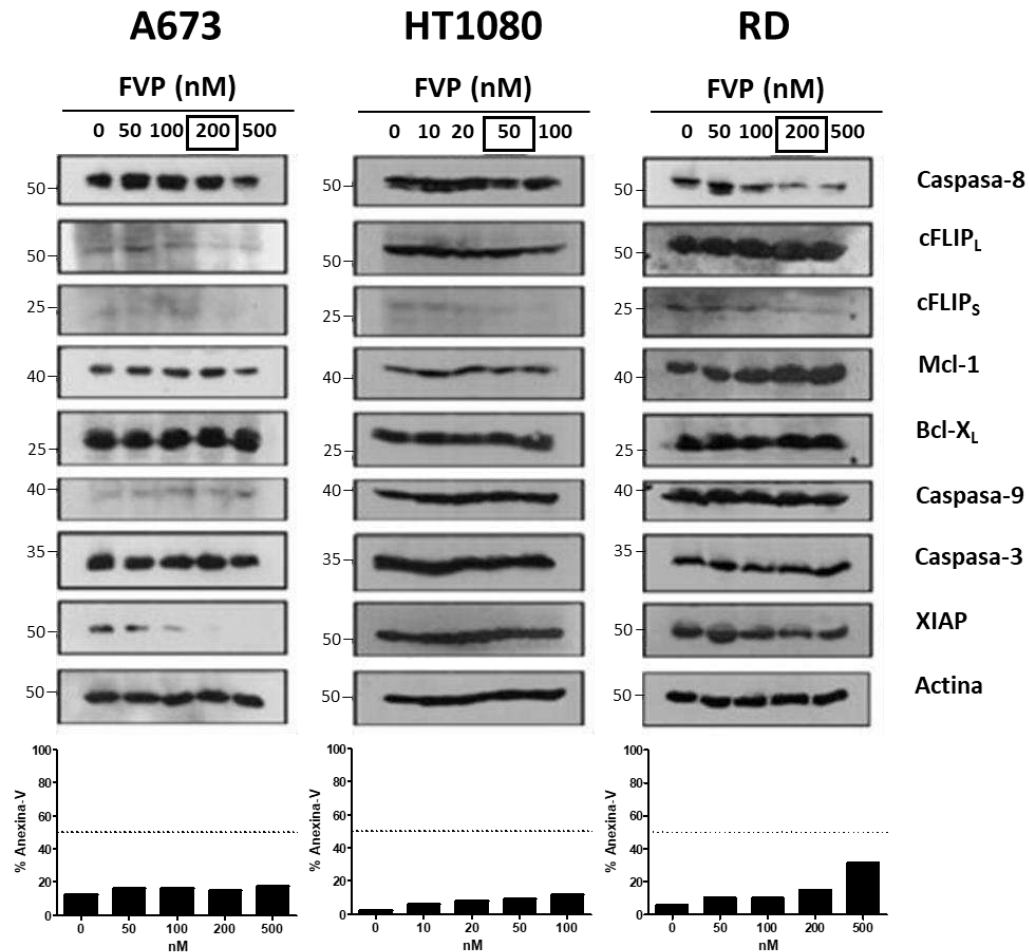


Figura 4.14 Análisis de la expresión de proteínas apoptóticas en líneas celulares de sarcoma tras el tratamiento con flavopiridol a diferentes concentraciones. Las líneas celulares A673, HT1080 y RD se trataron con concentraciones crecientes de flavopiridol (FVP) durante un periodo de 6 horas. Finalizada la incubación, las células se recolectaron y se lisaron para llevar a cabo la técnica *Western blot*. En paralelo se tomó una muestra para analizar la muerte celular por citometría de flujo.

Los datos obtenidos sugieren que en el mecanismo subyacente a la sensibilización del flavopiridol a la muerte inducida por TRAIL en las células de sarcoma estudiadas puede estar implicado el descenso observado en los niveles de expresión de algunas proteínas anti-apoptóticas como cFLIP (principalmente la isoforma cFLIP_S), y adicionalmente, en el caso de la línea celular A673, el descenso de la expresión de la proteína anti-apoptótica XIAP.

Si se observa la Figura 4.12, se puede comprobar que los efectos del flavopiridol descritos modifican la citotoxicidad de TRAIL soluble y/o LUV-TRAIL de forma diferente según la línea celular. En el caso de las células A673, el descenso en cFLIP y XIAP podría ser el responsable de incrementar la citotoxicidad principalmente de LUV-TRAIL, mientras que el descenso de cFLIP_s podría mejorar la citotoxicidad de ambas formulaciones en las células HT1080 pero no en las células RD, donde principalmente la forma soluble de la proteína presenta un aumento en su capacidad apoptótica.

4.2.3.2 Estudio del mecanismo de acción de doxorrubicina

El mismo análisis realizado para estudiar el efecto del flavopiridol como agente sensibilizante se realizó para el compuesto doxorrubicina.

El primer ensayo realizado sobre las células A673, HT1080 y RD fue un análisis de los receptores pro-apoptóticos y señuelo de TRAIL tras la incubación de 6 horas con doxorrubicina a la concentración sub-tóxica determinada con anterioridad. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 4.15.

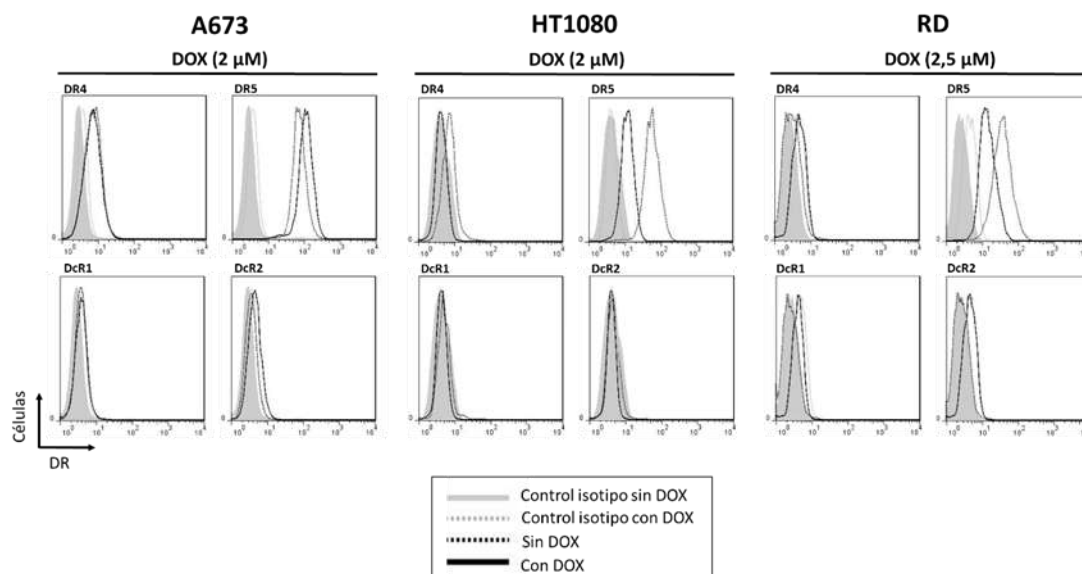


Figura 4.15 Expresión de receptores de TRAIL en la superficie celular tras el tratamiento con DOX en las células A673, HT1080 y RD. Las células se incubaron sin y con doxorrubicina (DOX) a una concentración de 2 μ M (A673 y HT1080) o 2,5 μ M (RD) durante 6 horas. Finalizado el tiempo, las células se lavaron con PBS y se marcaron con anticuerpos de citometría para los diferentes receptores de TRAIL.

El tratamiento de las células A673 con doxorubicina produjo un desplazamiento hacia la derecha del pico, esto es, un aumento de la expresión del receptor DR5 así como un ligero desplazamiento a la derecha de la expresión de DcR2. En el caso de la células HT1080, el tratamiento con doxorubicina produjo paradójicamente un descenso de la cantidad relativa de receptores pro-apoptóticos en superficie afectando tanto al receptor DR4, y en mayor medida, al receptor DR5.

Por otro lado, en la línea celular RD se observó desplazamiento en el pico de expresión de varios de los receptores tras el tratamiento con doxorubicina. Sin embargo, estos desplazamientos también se detectaron en el control de isotipo de las células RD incubadas con doxorubicina, lo que indica que los aumentos de expresión observados en las gráficas no correspondieron a un aumento real de la expresión en superficie, sino a un aumento de señal de auto-fluorescencia de la doxorubicina. Sin embargo, en el caso de la expresión del receptor pro-apoptótico DR5, a pesar de observarse un desplazamiento en el control de isotipo de las células incubadas con doxorubicina, sí se constató un desplazamiento significativo de su pico hacia la izquierda, esto es, se produjo un descenso en los niveles de DR5 en la superficie de las células RD cuando las células fueron incubadas con doxorubicina.

Los datos obtenidos del análisis de la expresión de receptores sugieren que doxorubicina no aumenta la sensibilidad de las células a TRAIL a través de un aumento en los niveles en superficie de los receptores por-apoptóticos DR4 o DR5. Paradójicamente, se produjo un descenso de la expresión de DR5 en la superficie tras el tratamiento de las células HT1080 y RD con doxorubicina. En el caso de las células HT1080, en las que se observó un efecto sensibilizante de doxorubicina cuando se usó en combinación con ambas formulaciones de TRAIL (Figura 4.12), la disminución de la expresión de los receptores producida por doxorubicina evidentemente no parece implicada en el mecanismo de sensibilización de doxorubicina, pero curiosamente tampoco afecta de manera negativa a la acción citotóxica combinada de doxorubicina y TRAIL (tanto TRAIL soluble como LUV-TRAIL). En las células RD el descenso de la expresión de DR5

inducido por doxorubicina no influye en ningún sentido en la falta de sensibilización observada en dicha línea celular con el tratamiento combinado de doxorubicina con ambas formulaciones de TRAIL (Figura 4.12).

Adicionalmente al análisis de expresión de receptores mortales en la superficie celular, se llevó a cabo un análisis de la expresión de algunas de las proteínas implicadas en la apoptosis, en este caso sobre las líneas celulares HT1080 y RD. Además, se realizó un marcaje con anexina-V en paralelo de todos los puntos experimentales para corroborar que el tratamiento con las distintas dosis de doxorubicina empleadas no ejercía *per se* muerte celular, pudiendo asumir de este modo que los posibles efectos observados pueden contribuir al efecto sensibilizante de este compuesto. Los resultados se muestran en la Figura 4.16.

Tal y como se observa en la Figura 4.16, la doxorubicina produjo un descenso en la expresión de proteínas anti-apoptóticas como cFLIP_L y Mcl-1 en la línea celular HT1080. Sin embargo, esta disminución se produjo únicamente en la dosis más alta de 5 μ M, la cual no corresponde a la concentración empleada en los ensayos del compuesto combinado con TRAIL, que fue de 2 μ M. En el caso de las células RD, se observó de manera similar un descenso en los niveles de expresión de cFLIP_L a la dosis más alta de 5 μ M (la dosis empleada en combinación con TRAIL fue de 2 μ M), pero además se detectó una disminución significativa de la proteína anti-apoptótica Bcl-X_L ya a partir de la primera dosis analizada de doxorubicina.

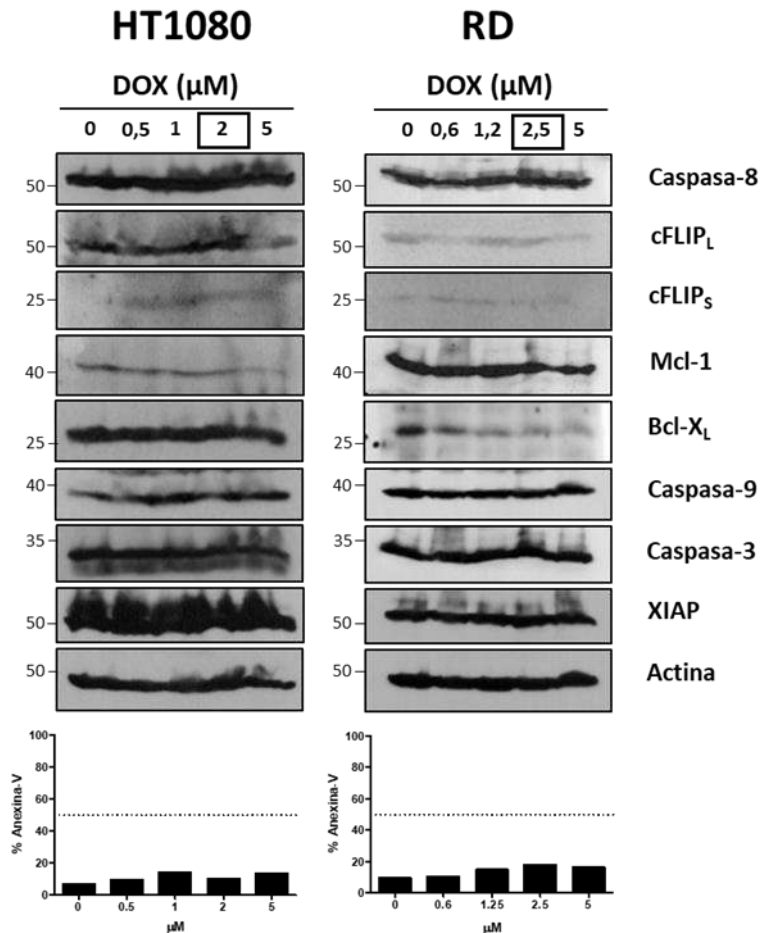


Figura 4.16 Análisis de la expresión de proteínas apoptóticas en líneas celulares de sarcoma tras el tratamiento con doxorrubicina a diferentes concentraciones. Las líneas celulares HT1080 y RD se trataron con concentraciones crecientes de doxorrubicina (DOX) durante un periodo de 6 horas. Finalizada la incubación, las células se recolectaron y se lisaron para llevar a cabo la técnica *Western blot*. En paralelo se tomó una muestra para analizar la muerte celular por citometría de flujo.

Los datos obtenidos en el análisis de la expresión de diversas proteínas involucradas en la regulación de la apoptosis mostraron que, en el caso de la línea celular HT1080, no se produjeron cambios en las cantidades relativas de las proteínas implicadas en la cascada apoptótica analizadas cuando se trataron con doxorrubicina a la dosis de 2 μM empleada en los tratamientos combinados con TRAIL. A la vista de los resultados obtenidos en las células HT1080 en el mecanismo de acción de la doxorrubicina a la muerte inducida por TRAIL, principalmente observado en la forma soluble, no parecen que intervengan

cambios en la expresión en superficie de los receptores de TRAIL ni variaciones en la expresión de las proteínas implicadas en la cascada apoptótica analizadas.

En lo que se refiere a las células RD, el descenso observado en los niveles de algunas proteínas anti-apoptóticas tras el tratamiento con doxorubicina, principalmente descenso de Bcl-X_L, no parece mejorar la capacidad apoptótica de TRAIL en ninguna de las dos formulaciones estudiadas.

Sería necesario la realización de nuevos experimentos para determinar el efecto de doxorubicina en la sensibilización a la apoptosis por TRAIL observado en las células de sarcoma (Figura 4.12).

4.2.3.3 Estudio del mecanismo de acción de trabectedina

Como en los apartados anteriores, el estudio del efecto de trabectedina sobre las líneas celulares de sarcoma se inició con un análisis de los niveles de expresión en la membrana plasmática de los cuatro receptores específicos de TRAIL, siguiéndose el mismo protocolo que el empleado para los compuestos flavopiridol y doxorubicina. Los datos obtenidos se representan en la Figura 4.17.

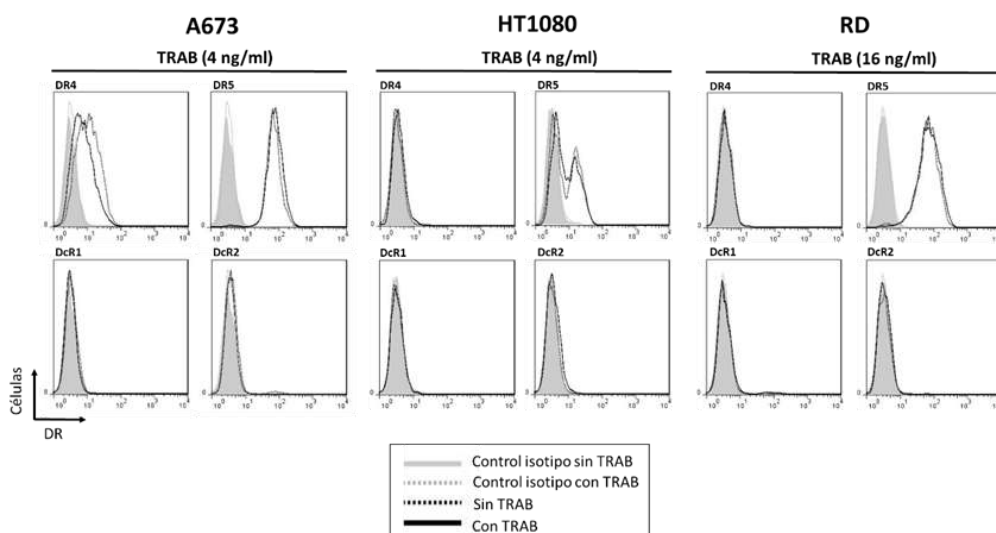


Figura 4.17 Expresión de receptores de TRAIL en la superficie celular tras el tratamiento con TRAB en las células A673, HT1080 y RD. Las células se incubaron sin y con trabectedina (TRAB) a una concentración de 4 ng/ml (A673 y HT1080) o 16 ng/ml (RD) durante 6 horas. Finalizado el tiempo, las células se lavaron con PBS y se marcaron con anticuerpos de citometría para los diferentes receptores de TRAIL.

Las células A673 tratadas con trabectedina presentaron un ligero desplazamiento hacia la izquierda del pico de expresión de DR4, lo que se traduciría en un descenso de la cantidad del receptor en la superficie celular inducido por la molécula. Por otra parte, la trabectedina no produjo modificaciones en la cantidad relativa de los diferentes receptores de TRAIL en superficie de las células HT1080 y RD cuando fueron tratadas con el compuesto a las condiciones establecidas.

Posteriormente, se realizó un análisis proteico de varios componentes de la cascada apoptótica tras la estimulación durante 6 horas de las células de sarcoma con diferentes concentraciones de trabectedina. Una vez más, se llevó a cabo un marcaje con anexina-V en paralelo de todos los puntos experimentales incluidos en el estudio para comprobar que el tratamiento con las distintas dosis de trabectedina empleadas no ejercían muerte celular *per se*, pudiendo de esta manera asumir que los posibles efectos observados contribuyen al efecto sensibilizante de trabectedina. Los resultados se muestran en la Figura 4.18.

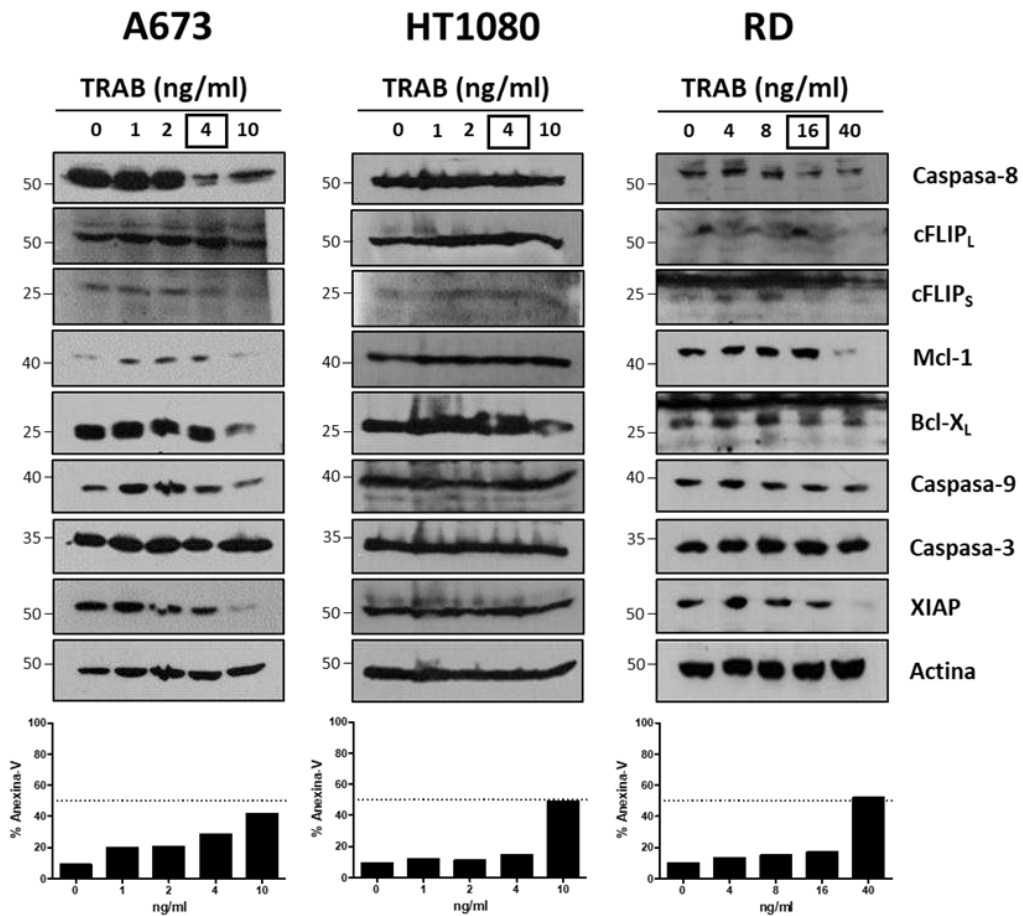


Figura 4.18 Análisis de la expresión de proteínas apoptóticas en líneas celulares de sarcoma tras el tratamiento con trabectedina a diferentes concentraciones. Las líneas celulares A673, HT1080 y RD se trataron con concentraciones crecientes de trabectedina (TRAB) durante un periodo de 6 horas. Finalizada la incubación las células se recolectaron y se lisaron para llevar a cabo la técnica *Western blot*. En paralelo se tomó una muestra para analizar la muerte celular por citometría de flujo.

La Figura 4.18 muestra cómo trabectedina alteró la expresión de algunas de las proteínas estudiadas a dosis altas. En el caso de las células A673 se produjo una disminución en los niveles de las proteínas anti-apoptóticas cFLIP_S, Mcl-1, Bcl-X_L y XIAP, cuando trabectedina se incubó a una concentración de 10 ng/ml. También se observó una ligera disminución en la cantidad relativa de las pro-caspasas-8 y -9 a dicha dosis. Este hecho podría explicarse debido a la activación y formación de sus correspondientes formas procesadas, ya que se detectó un incremento considerable en los niveles de muerte celular analizados a

dicha concentración. En el caso de las células HT1080 sólo se vio afectada ligeramente la expresión de Bcl-X_L cuando se trataron con 10 ng/ml de trabectedina, que como en las otras líneas celulares, corresponde a una dosis superior a la determinada como sub-tóxica y que fue la empleada en los experimentos de sensibilización a la muerte inducida por TRAIL. En la línea celular RD, las proteínas anti-apoptóticas cFLIP_S, cFLIP_L, Mcl-1 y XIAP también descendieron, aunque exclusivamente a la dosis de 40 ng/ml de trabectedina, concentración más elevada a la considerada sub-tóxica.

Los resultados obtenidos de los dos ensayos realizados para caracterizar la sensibilización de trabectedina a la muerte inducida por TRAIL no aportaron conclusiones al respecto del mecanismo de acción del compuesto, ya que sólo se detectaron modificaciones en las proteínas analizadas a concentraciones de trabectedina superiores a las utilizadas en los tratamientos combinados con ambas formulaciones de TRAIL.

Al igual que para doxorrubicina, se requeriría el diseño y realización de nuevos experimentos para determinar el efecto de trabectedina en la sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL observado en las células de sarcoma (Figura 4.12).

4.2.4 Caracterización de la muerte celular inducida por TRAIL en combinación con flavopiridol

La combinación de TRAIL con el agente sensibilizante flavopiridol ha potenciado la capacidad citotóxica del ligando mortal en todas las líneas celulares de sarcoma con distintas sensibilidad a la muerte inducida TRAIL, como se ha demostrado en el apartado 4.2.2. Es por ello que se seleccionó el compuesto flavopiridol para caracterizar de una manera más detallada la muerte celular inducida por el tratamiento combinado de flavopiridol con ambas formulaciones de TRAIL en las líneas celulares A673, HT1080 y RD.

En primer lugar se quiso determinar la presencia del característico fenotipo apoptótico mediante el estudio de la morfología nuclear con microscopía de

fluorescencia. En este experimento, las células se trataron con TRAIL (en forma soluble y asociado a liposomas) con y sin previo tratamiento con flavopiridol. Posteriormente, las muestras se tiñeron con *Hoechst* 33342 para realizar un análisis de la morfología nuclear. Además y en paralelo, se realizó un análisis cuantitativo de la muerte celular en cada punto experimental analizando el porcentaje de células anexina-V positivas mediante citometría de flujo. Las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 4.19.

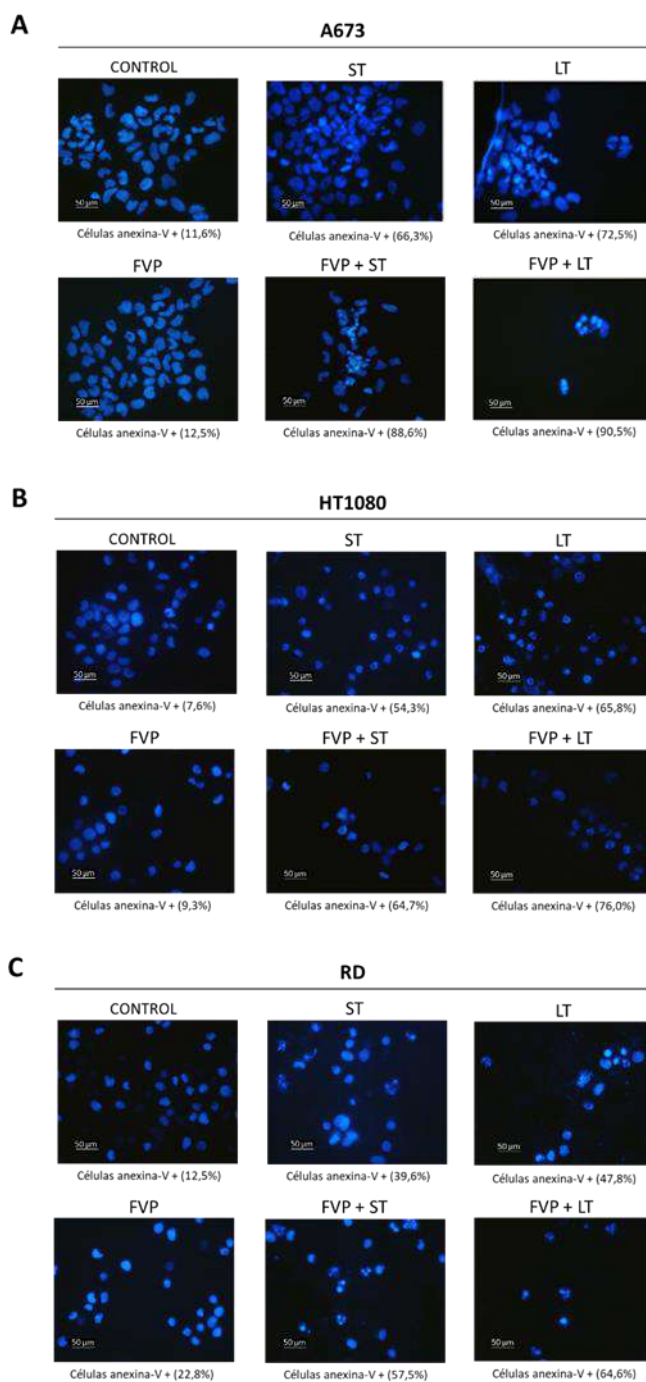


Figura 4.19 Marcaje nuclear de células de sarcoma tratadas con TRAIL sin y con flavopiridol. Las células A673 (A), HT1080 (B) y RD (C) se incubaron con sTRAIL (ST) y LUV-TRAIL (LT) a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ durante un periodo de 16 horas. En paralelo, se aplicó el mismo tratamiento a células pre-incubadas con flavopiridol (FVP) a la concentración sub-tóxica durante una hora. Tras finalizar el experimento, se tomó una muestra para analizar la muerte celular mediante citometría de flujo y las células se marcaron con *Hoechst* 33342.

La muerte celular inducida por TRAIL, observada en las imágenes correspondientes a los tratamientos en presencia o ausencia de flavopiridol, reflejó una morfología característica de una muerte por apoptosis en la que se observaron células con condensación de la cromatina y fragmentación de la misma, originando los denominados cuerpos apoptóticos.

Todas las líneas celulares analizadas presentaron mayor sensibilidad a la muerte inducida por LUV-TRAIL frente a sTRAIL, y a su vez el tratamiento con flavopiridol mejoró la sensibilidad en ambas formas de la proteína. Estos datos, obtenidos al analizar las células anexina-V positivas de cada punto experimental, correlacionaron con la mayor detección de núcleos apoptóticos de las muestras correspondientes.

Para analizar más en profundidad el papel de las proteínas implicadas en la activación de la muerte apoptótica inducida por TRAIL, se realizaron experimentos en los que se emplearon diferentes moléculas inhibidoras. Las células se sometieron al tratamiento combinado de flavopiridol y TRAIL tras la incubación con los diferentes agentes bloqueantes y posteriormente, se analizaron los niveles de muerte celular mediante el marcaje con anexina-V. Los resultados se muestran en la Figura 4.20.

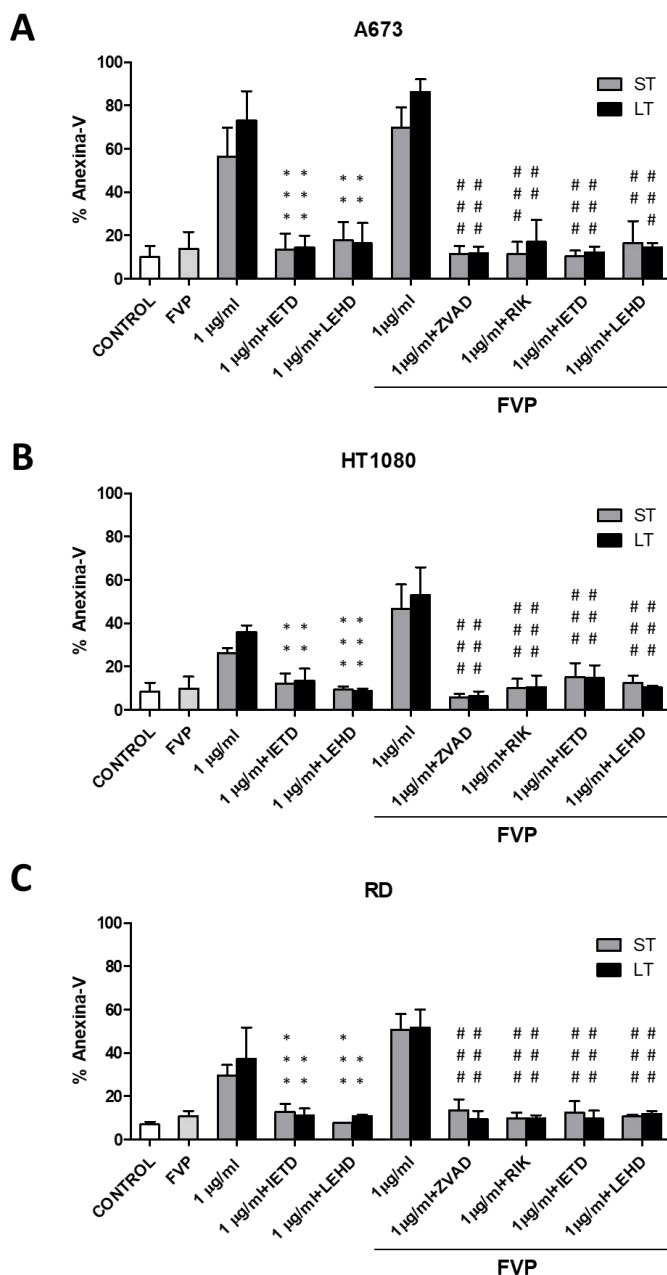


Figura 4.20 Caracterización de la muerte celular inducida por sTRAIL y LUV-TRAIL en líneas celulares de sarcoma pre-tratadas con flavopiridol. Las células A673 (A), HT1080 (B) y RD (C) se pre-incubaron con los inhibidores RIK (500 ng/ml), z-VAD-fmk (30 μ M) y z-IETD-fmk (30 μ M) y z-LEHD-fmk (30 μ M) durante 1 hora. Posteriormente, las células se trataron con sTRAIL (ST) y LUV-TRAIL (LT) a una concentración de 1 μ g/ml, en presencia o ausencia de flavopiridol (FVP). A las 16 horas de tratamiento, se analizó la muerte celular mediante marcaje con anexina-V. Las gráficas muestran la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes. El signo asterisco indica la significación entre ST/LT sólo y ST/LT combinado con el inhibidor (** p <0,005, *** p <0,001, \pm 95%CI). El signo almohadilla indica la significación entre ST/LT tratado con flavopiridol y ST/LT tratado con flavopiridol combinado con el inhibidor (## p <0,005, ### p <0,001, \pm 95%CI).

En primer lugar, el tratamiento con flavopiridol potenció la capacidad citotóxica del ligando mortal en las dos formulaciones estudiadas (proteína soluble y asociado a liposomas). La muerte celular inducida por TRAIL en todas las líneas celulares presentó un bloqueo muy significativo tanto cuando se inhibió la caspasa-8 (inhibidor z-IETD-fmk) como con la inhibición de la caspasa-9 (inhibidor z-LEHD-fmk). Por otra parte, aunque el tratamiento con flavopiridol potenció la capacidad citotóxica de TRAIL en las dos formulaciones (sTRAIL y LUV-TRAIL), esta mayor capacidad apoptótica también se vio bloqueada de forma muy significativa en los 3 tipos celulares cuando se incubaron previamente con el anticuerpo bloqueante de TRAIL (RIK), con el inhibidor de caspasas (z-VAD-fmk) así como con los inhibidores específicos de la caspasa-8 y -9, llegándose a restaurar por completo los niveles basales de muerte celular.

Los datos obtenidos permiten concluir que la inducción de muerte celular por TRAIL cuando se combina con flavopiridol depende fundamentalmente de la presencia de TRAIL, tanto en el caso de sTRAIL como es lógico, pero también en el caso de LUV-TRAIL, de modo que el efecto de flavopiridol es sensibilizador sin participar directamente en la muerte celular. Por otra parte, la muerte celular en el tratamiento combinado de flavopiridol con ambas formulaciones de TRAIL es eminentemente un proceso dependiente de caspasas ya que la pre-incubación con un inhibidor general de caspasas bloqueó completamente la muerte celular. Por último, tanto en presencia como ausencia de flavopiridol, la apoptosis es mediada por las caspasas-8 y -9. Además, el bloqueo de una de ellas impide la inducción de la correcta activación de la cascada apoptótica que ejecuta la muerte celular, lo que indica que, aunque probablemente la activación inicial de las caspasas sea a través de la activación de la caspasa-8 por la vía extrínseca de la apoptosis, la vía mitocondrial de la apoptosis activando caspasa-9 también participa de manera necesaria en la muerte celular en las 3 líneas celulares, indicando que las 3 son células de tipo II en lo referente a la muerte inducida por TRAIL.

Para estudiar más en profundidad la activación de la ruta apoptótica generada por TRAIL en combinación con flavopiridol, se llevó a cabo un ensayo

de análisis proteico mediante *Western blot*. Las células, en presencia o ausencia de flavopiridol, se incubaron con sTRAIL y LUV-TRAIL. Tras finalizar el experimento, se analizaron los niveles de expresión de las diferentes proteínas implicadas en la activación de la cascada apoptótica correspondientes a cada tratamiento. Además y en paralelo, se realizó un análisis cuantitativo de la muerte celular en cada punto experimental analizando el porcentaje de células anexina-V positivas mediante citometría de flujo. El resultado se muestra en la Figura 4.21.

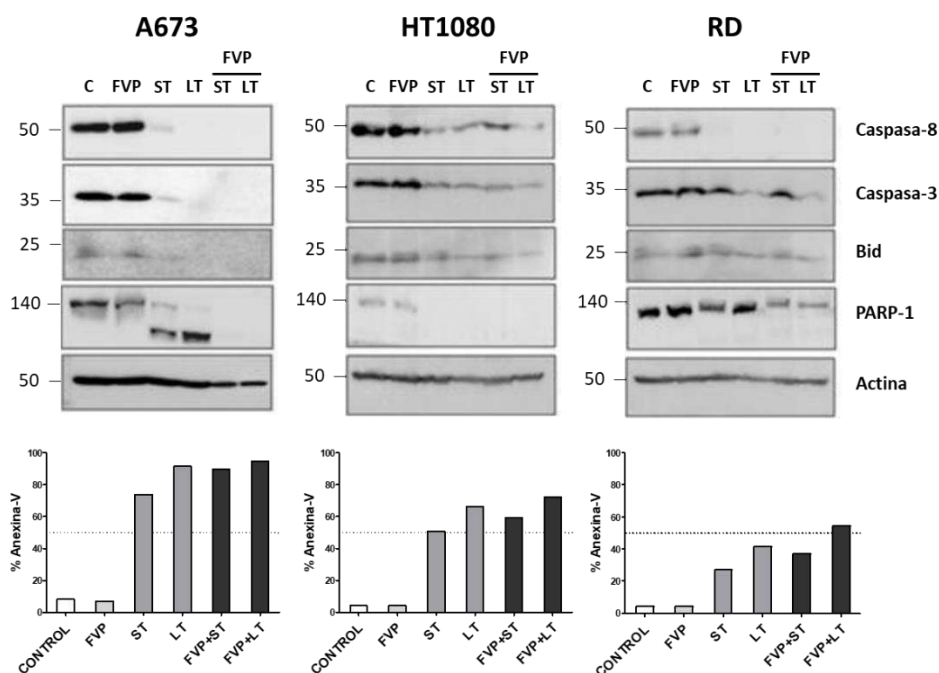


Figura 4.21 Análisis de activación de las proteínas apoptóticas tras el tratamiento con TRAIL en presencia y ausencia de flavopiridol en líneas celulares de sarcoma. Las células A673, HT1080 y RD se trataron con 1 µg/ml de sTRAIL (ST) y LUV-TRAIL (LT) sin y con una preincubación de flavopiridol (FVP) a la dosis sub-tóxica correspondiente durante 1 hora. Tras finalizar el experimento a las 16 horas, las células se recolectaron y se lisaron. El análisis proteico se llevó a cabo mediante *Western blot*. El análisis de la muerte celular se realizó mediante marcaje con anexina-V y análisis por citometría de flujo.

Las dos formulaciones de TRAIL (sTRAIL y LUV-TRAIL) indujeron una activación de la ruta extrínseca de la apoptosis, como se observa en la Figura 4.21, a través del procesamiento de la caspasa-8 y -3 con sus respectivos sustratos, Bid y PARP-1, en las tres líneas celulares analizadas. El tratamiento con flavopiridol incrementó eficazmente la activación de la cascada de la ruta

extrínseca, induciendo una mayor disminución en los niveles de prácticamente todas las proteínas analizadas, lo que se tradujo en una ejecución de muerte celular mucho más eficiente, tanto para sTRAIL como para LUV-TRAIL cuando se combinaron con flavopiridol. Además, el tratamiento con flavopiridol no tuvo ningún efecto en la activación de proteínas pro-apoptóticas en ninguna de las 3 líneas celulares analizadas.

4.2.4.1 Análisis del efecto a largo plazo en la supervivencia celular del tratamiento combinado de TRAIL con flavopiridol

Los datos obtenidos a lo largo de los diferentes análisis muestran cómo el agente sensibilizante flavopiridol fue capaz de mejorar la citotoxicidad de sTRAIL y LUV-TRAIL mediante una activación más eficiente de la cascada apoptótica. Adicionalmente, se quiso analizar si el tratamiento con TRAIL en células estimuladas con flavopiridol tiene efecto en la supervivencia y proliferación celular a largo plazo. Para ello se llevó a cabo un ensayo clonogénico cuyos resultados se muestran en la Figura 4.22.

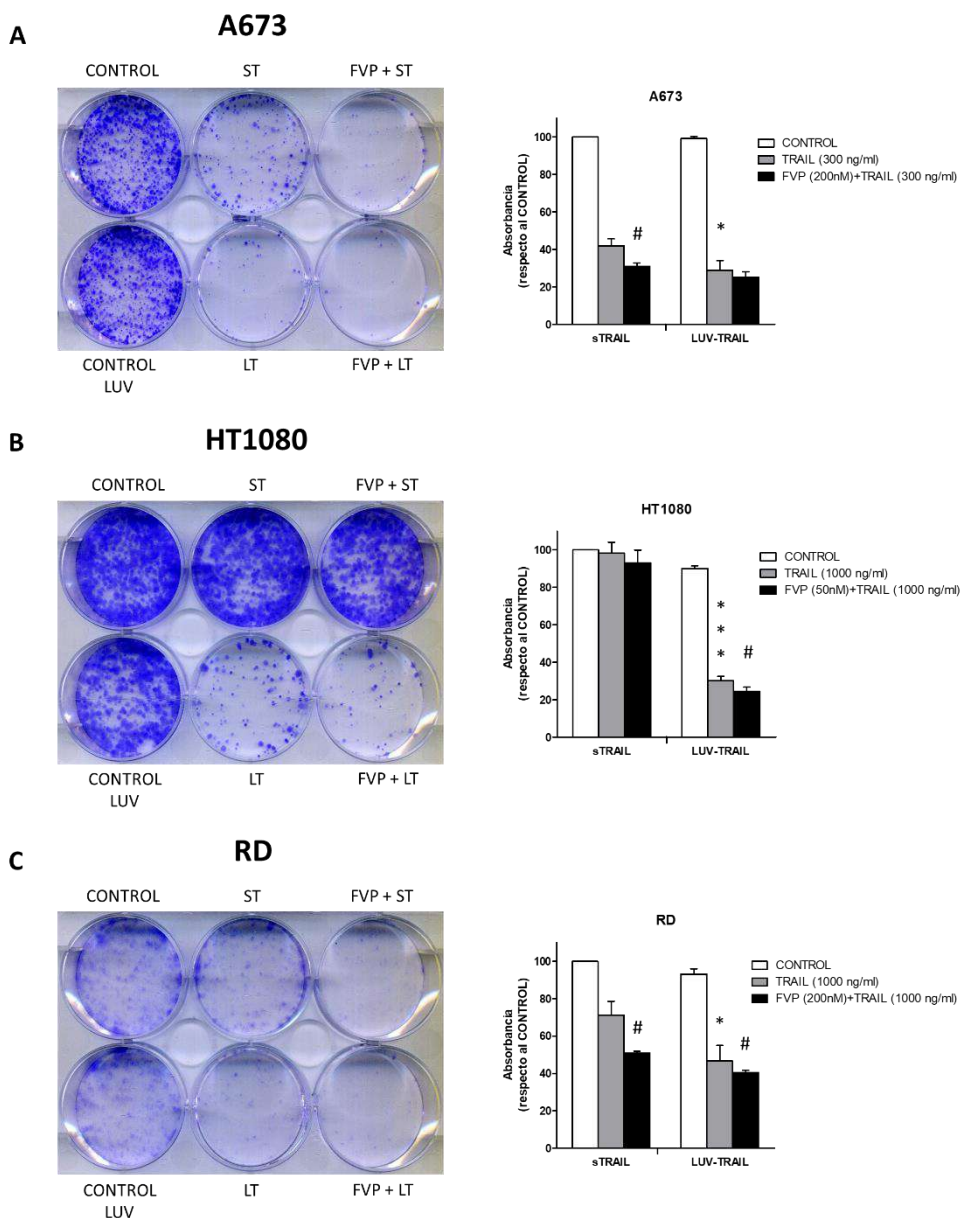


Figura 4.22 Ensayo clonogénico del tratamiento con TRAIL en células de sarcoma pre-incubadas con flavopiridol. Las líneas celulares A673 (A), HT1080 (B) y RD (C) se trataron durante 1 hora con flavopiridol (FVP) a dosis de 200 nM (A673 y RD) y 50 nM (HT1080). Tras la incubación se adicionó sTRAIL (ST) y LUV-TRAIL (LT) en células tratadas y no tratadas con FVP a una concentración de 1 μ g/ml (HT1080 y RD) o 300 ng/ml (A673). Al día siguiente, se sustituyó el medio por medio fresco y tras 11 días de experimento, las células se fijaron y se tiñeron con cristal violeta. La cuantificación del cristal violeta se llevó a cabo mediante la medición de la absorbancia del compuesto a 550 nm tras la disolución de los cristales en DMSO. Las gráficas muestran la media \pm SD de la absorbancia de las células tratadas expresado en porcentaje con respecto a las células no tratadas (control). El signo asterisco indica la significación entre ST y LT (* p <0,05, *** p <0,001, \pm 95%CI). El signo almohadilla indica la significación entre ST/LT sólo y ST/LT combinado con FVP (# p <0,05, \pm 95%CI).

En las imágenes de las placas de 6 pocillos teñidas con cristal violeta se puede observar como el tratamiento con TRAIL en las células A673 tuvo un gran efecto negativo a largo plazo sobre el crecimiento celular, siendo más potente el efecto de LUV-TRAIL frente a la proteína soluble. El compuesto flavopiridol aumentó el bloqueo en la proliferación, principalmente cuando se combinó con sTRAIL. En concordancia con lo observado en la placa, los valores de absorbancia mostraron diferencias significativas entre sTRAIL y LUV-TRAIL, así como entre la proteína soluble y el efecto de ésta en combinación con flavopiridol.

Por otro lado, las células HT1080 no presentaron una reducción en la proliferación celular cuando se trataron con sTRAIL en ausencia o presencia de flavopiridol. En contraposición, LUV-TRAIL produjo un descenso en la supervivencia celular muy pronunciado con respecto al control, cuyos valores de absorbancia fueron muy significativamente menores en comparación con el tratamiento del ligando mortal en forma soluble. Esta reducción del crecimiento celular a largo plazo ejercida por LUV-TRAIL fue capaz de potenciarse significativamente cuando las células fueron pre-tratadas con flavopiridol.

Los resultados obtenidos del tratamiento con TRAIL en las células RD indicaron que LUV-TRAIL tiene mayor efecto en la reducción del crecimiento celular a largo plazo en comparación con la proteína soluble, marcando los valores de absorbancia una diferencia significativa entre ambos tratamientos. Además, la sensibilización con flavopiridol potenció este efecto bloqueante de un modo significativo para las dos formas de TRAIL estudiadas.

Los datos adquiridos en este ensayo experimental permiten concluir que existe un efecto a largo plazo en el descenso de la proliferación y supervivencia celular ejercido por TRAIL en células humanas de sarcoma, siendo significativamente más potente en el caso de los LUV-TRAIL. Además, este efecto a largo plazo bloqueando la proliferación y supervivencia celular se puede ver potenciado significativamente si las células son pre-incubadas con el inhibidor de Cdk's flavopiridol.

4.3 Tratamiento combinado de TRAIL con inhibidores de histona deacetilasas

Una característica muy común en las células transformadas tumoralmente es el elevado grado de regulación epigenética, mediado por los niveles de plegamiento de la cromatina. Se ha constatado que la mayor parte de células tumorales presentan grandes cantidades de histona deacetilasas, enzimas que modifican la expresión genética a través de las histonas, regulando entre otros genes, genes pro-apoptóticos y silenciando aquellos implicados en la supresión tumoral, generando de este modo un fenotipo resistente a la apoptosis [381].

La investigación de pequeñas moléculas capaces de bloquear la actividad histona deacetilasa de estas enzimas ha reportado resultados muy positivos en la restauración de la sensibilidad a la apoptosis en una amplia variedad de células tumorales [382, 383]. Este descubrimiento hizo que la familia de inhibidores de histona deacetilasas (inhibidores de HDAC) se convirtieran en prometedores agentes anti-tumorales, llegando a usarse en el tratamiento para ciertos tipos de cáncer [384-386].

En la literatura científica, se ha descrito la capacidad de los inhibidores de HDAC para sensibilizar a la apoptosis inducida por TRAIL, proceso que está mediado por modificaciones en la expresión de diferentes proteínas, como por ejemplo, un aumento en los niveles de los receptores pro-apoptóticos o caspasas, o un bloqueo de la expresión de proteínas anti-apoptóticas como cFLIP, Bcl-X_L o XIAP [387-391]. Es por ello que el estudio de los inhibidores de HDAC como potenciales agentes sensibilizantes al efecto de TRAIL tiene gran interés en líneas celulares de sarcoma, especialmente en aquellas células que presentan un fenotipo resistente a la citotoxicidad inducida por TRAIL (RH4 y CADO-ES) debido a niveles bajos o ausencia de la caspasa iniciadora caspasa-8.

Los inhibidores de HDAC seleccionados para la realización del estudio de tratamiento combinado con TRAIL en células de sarcoma fueron el ácido valpróico (VPA) y FK228. Estas moléculas forman parte de los tres únicos inhibidores de HDAC aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) para el tratamiento

de pacientes con cáncer [387]. Por una parte, se ha descrito que VPA potencia la inducción de apoptosis por TRAIL favoreciendo una adecuada activación del DISC [158, 392], mientras que FK228 actúa a nivel de la regulación de proteínas que intervienen en la ruta intrínseca de la apoptosis y en la regulación del ciclo celular [393-395].

4.3.1 Estudio del efecto combinatorio de TRAIL con inhibidores de HDAC en líneas celulares de sarcoma sensibles a TRAIL

Aunque el principal objetivo del planteamiento de los experimentos con inhibidores de HDAC fue el de restablecer la capacidad citotóxica de TRAIL en las células tumorales de sarcoma resistentes a este ligando mortal mediante el tratamiento en combinación con dichos compuestos, también se quiso valorar una posible sinergia en el tratamiento de células tumorales de sarcoma con cierta sensibilidad a TRAIL, empleando en este caso las células HT1080 como modelo.

Las células HT1080 se incubaron con VPA y FK228 a diferentes concentraciones durante 24 horas en un ensayo dosis-respuesta con el objetivo de analizar la citotoxicidad individual de cada uno de los inhibidores HDAC y poder seleccionar una concentración que induzca una toxicidad celular inferior al 20% en el tratamiento con el compuesto de forma individualizada, determinando así una concentración sub-tóxica que permita ver un posible efecto sinérgico en la posterior combinación con TRAIL. (Figura 4.23).

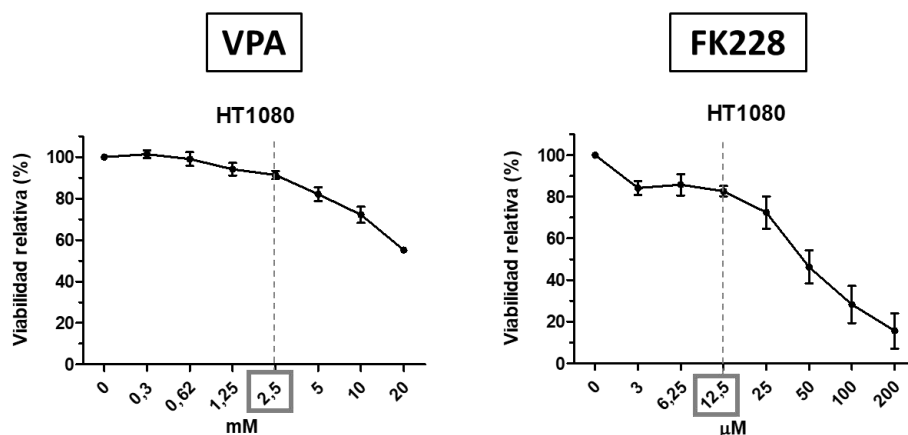


Figura 4.23 Ensayo dosis-respuesta de los inhibidores de HDAC en las células HT1080. La línea celular HT1080 se trató con diferentes concentraciones de VPA y FK228 durante 24 horas. El ensayo se analizó mediante MTT. Las gráficas muestran la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes.

Las células HT1080 presentaron una sensibilidad moderada dentro del rango de concentraciones analizadas para el compuesto VPA. En este caso, a la dosis máxima, correspondiente a 20 mM, la viabilidad celular se redujo hasta un 60%. Por el contrario, el inhibidor FK228 tuvo mayor efecto citotóxico ya que dentro del margen de concentraciones estudiadas para el mismo, se llegó a un descenso de la viabilidad celular de un 80% a la dosis de 200 μ M. De este modo, las concentraciones sub-tóxicas seleccionadas para las células HT1080 fueron 2,5 mM de VPA y 12,5 μ M de FK228 (Figura 4.23).

Los ensayos de combinación de los diferentes inhibidores de HDAC con TRAIL, tanto con la forma soluble como con la asociada a los liposomas, se realizaron mediante una incubación inicial de las células HT1080 con VPA y FK228 (a las concentraciones sub-tóxicas correspondientes) durante un periodo de 24 horas, seguido de la adición de TRAIL a una concentración de 1 μ g/ml, en sus dos formulaciones. Tras 6 horas de exposición con TRAIL, se analizó la viabilidad celular mediante la técnica MTT. Los resultados se muestran en la Figura 4.24.

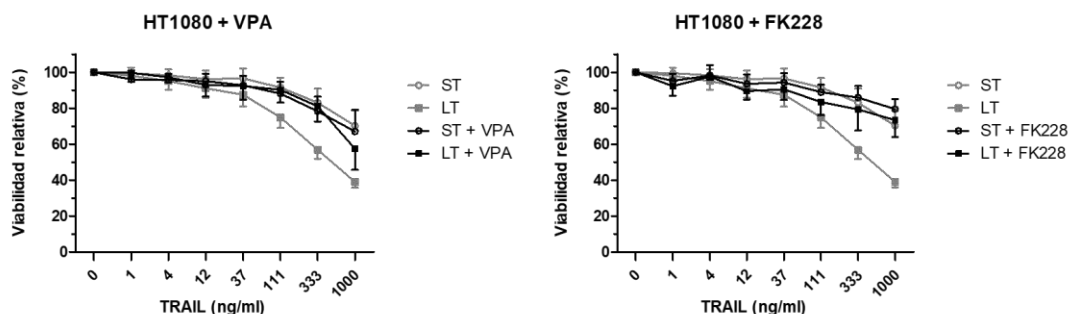


Figura 4.24 Análisis del efecto citotóxico de sTRAIL y LUV-TRAIL en células HT1080 tras el pre-tratamiento con inhibidores de HDAC. Las células fueron pre-incubadas con VPA (2,5 mM) y FK228 (12,5 μ M) durante 24 horas. Finalizada la pre-incubación se añadió sTRAIL (ST) y LUV-TRAIL (LT) a una dosis de 1 μ g/ml. Las células permanecieron un periodo de 6 horas de tratamiento, tras el cual se analizó la viabilidad celular por MTT. Las gráficas muestran la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes.

Las células HT1080 presentaron un menor descenso de la viabilidad celular cuando se trataron de forma conjunta con VPA y TRAIL, observándose esta disminución de la acción tóxica fundamentalmente en el caso del tratamiento en combinación con LUV-TRAIL, tanto en la combinación con VPA como con FK228.

A la vista de los datos obtenidos en los experimentos realizados en las células HT1080, se puede concluir que la combinación de TRAIL, fundamentalmente LUV-TRAIL, con los inhibidores de HDAC VPA y FK228, no sólo no mejora el potencial citotóxico de TRAIL, sino que ejerce un efecto antagónico en comparación con la actividad citotóxica de LUV-TRAIL. Resulta interesante que este efecto desfavorable de la combinación de los inhibidores de HDAC con TRAIL se observa con la forma asociada a los liposomas, lo que sugiere que el efecto que tienen los compuestos VPA y FK228 sobre la línea celular HT1080 se produce a nivel de algún elemento que interviene en la inducción de apoptosis a nivel diferencial por parte de la forma transmembrana del ligando respecto a su forma soluble.

4.3.2 Estudio del efecto combinatorio de TRAIL con inhibidores de HDAC en líneas celulares de sarcoma resistentes a TRAIL

Las líneas celulares de sarcoma resistentes a TRAIL empleadas en este trabajo presentan un fenotipo con deficiencias en la expresión de proteínas clave en la ruta apoptótica a través de la vía extrínseca, como es la caspasa-8. La modificación en la expresión genética de proteínas pro-apoptóticas inducida por los inhibidores de HDAC es posible que ejerza un efecto sensibilizador a la muerte inducida por TRAIL en estas líneas celulares, RH4 y CADO-ES.

Las células RH4 y CADO-ES se incubaron individualmente con un rango creciente de concentraciones de VPA y FK228 durante 24 horas (Figura 4.25). La toxicidad individual de los compuestos se analizó con el objetivo de seleccionar una dosis sub-tóxica con la que trabajar en el tratamiento combinado con TRAIL.

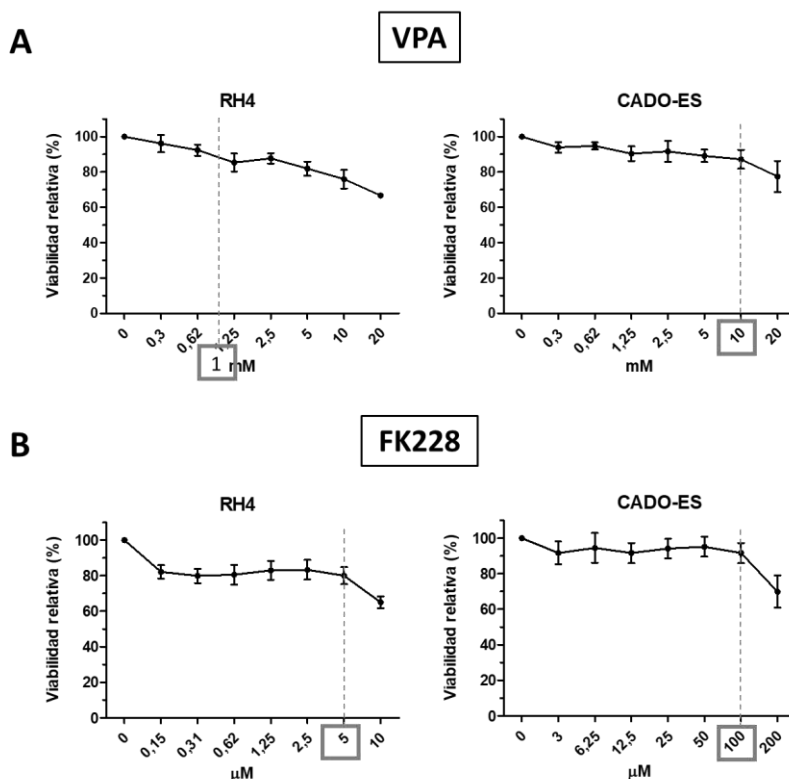


Figura 4.25 Ensayo dosis-respuesta de los inhibidores de HDAC en las células RH4 y CADO-ES. Las líneas celulares RH4 y CADO-ES se trataron con diferentes concentraciones de VPA (A) y FK228 (B) durante 24 horas. El ensayo se analizó mediante MTT. Las gráficas muestran la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes.

El compuesto VPA presentó una baja toxicidad dentro del rango de concentraciones estudiadas (0-20 mM) tanto en las células RH4 y CADO-ES, alcanzando en la dosis máxima una viabilidad relativa del 70% y 80% respectivamente. En cuanto al inhibidor FK228 administrado de forma individual también produjo descensos en la viabilidad, mostrando valores del 70% de viabilidad relativa cuando se incubó a 10 μ M en las células RH4 y 200 μ M en CADO-ES.

Las concentraciones sub-tóxicas que fueron seleccionadas tras el análisis de los datos mostrados en la Figura 4.25, correspondieron a las concentraciones de 1 mM y 10 mM de VPA para las células RH4 y CADO-ES respectivamente, y 5 μ M y 100 μ M para el inhibidor FK228. Se pudo observar la especial sensibilidad de las células RH4 al efecto de los dos inhibidores de HDAC, cuyas concentraciones sub-tóxicas seleccionadas fueron de un orden 10 veces menor al correspondiente a las células CADO-ES para el compuesto VPA y 100 veces menor al del inhibidor FK228.

Para el estudio completo del posible efecto sensibilizador de los inhibidores HDAC a la muerte celular inducida por TRAIL en células resistentes a la apoptosis inducida por dicho ligando mortal, los ensayos de combinación con TRAIL se realizaron variando tanto los tiempos de pre-incubación con los compuestos VPA y FK228, como los periodos de incubación con TRAIL.

El primer bloque experimental realizado consistió en tratar las células RH4 y CADO-ES durante periodos cortos de tiempo con los agentes inhibidores VPA y FK228 a las concentraciones sub-tóxicas previamente determinadas. Los tiempos de incubación con los inhibidores de HDAC elegidos fueron 1 hora y 6 horas. Seguidamente, se administró sTRAIL y LUV-TRAIL (1 μ g/ml) en un tratamiento combinado con el inhibidor correspondiente que concluyó tras 24 horas de la adición del ligando mortal. Los resultados del ensayo se muestran en términos de viabilidad relativa en la Figura 4.26.

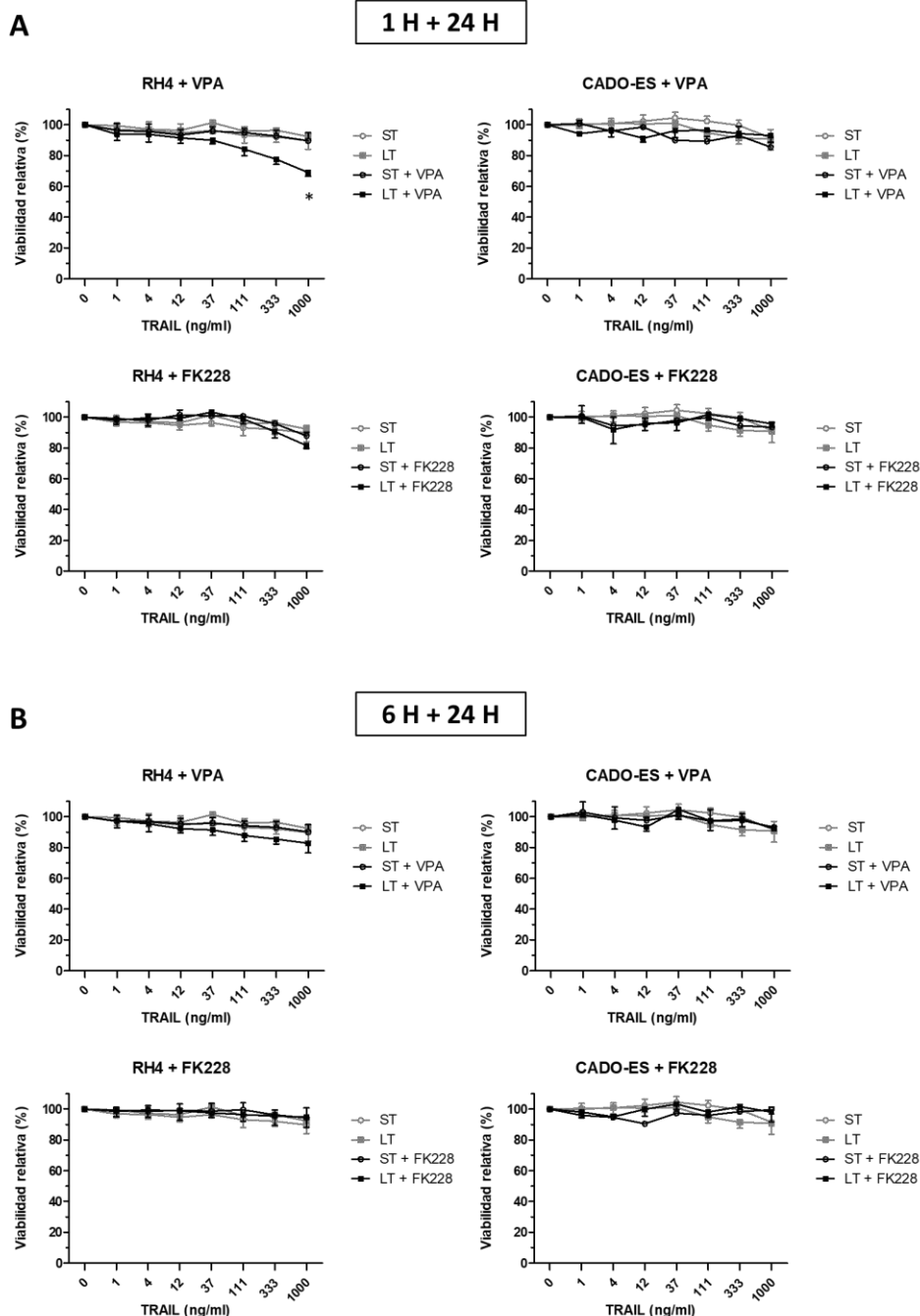


Figura 4.26 Análisis del efecto citotóxico de sTRAIL y LUV-TRAIL en células RH4 y CADO-ES tras el pre-tratamiento con inhibidores de HDAC a tiempos cortos. Las células fueron pre-incubadas con VPA (RH4 a 1 mM y CADO-ES a 10 mM) y FK228 (RH4 a 5 μ M y CADO-ES a 100 μ M) durante 1 hora (A) y 6 horas (B). Finalizada la pre-incubación se añadió sTRAIL (ST) y LUV-TRAIL (LT) a una dosis de 1 μ g/ml. Las células permanecieron un periodo de 24 horas de tratamiento tras el cual se analizó la viabilidad celular por MTT. Las gráficas muestran la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes.

Las células RH4 tratadas con VPA durante 1 hora mostraron un aumento ligeramente significativo de la capacidad tóxica de LUV-TRAIL cuando se administró a la concentración máxima de 1 µg/ml, sin observarse cambios en la forma soluble del ligando mortal. Esta sensibilización observada en el tratamiento combinado de VPA durante 1 hora y la posterior adición de los LUV-TRAIL ya no se observó cuando el periodo de pre-incubación con VPA aumentó a 6 horas. El compuesto FK228 no produjo cambios en la capacidad citotóxica de sTRAIL o LUV-TRAIL en ninguno de los dos periodos de incubación con el inhibidor de HDAC analizados.

En relación a la línea celular CADO-ES, la resistencia a la muerte celular inducida por sTRAIL y LUV-TRAIL no se vio modificada tras la incubación previa con ninguno de los 2 inhibidores de HDAC empleados, VPA y FK228, y a ninguno de los dos periodos de pre-incubación estudiados.

Los datos obtenidos del análisis a tiempos cortos de incubación con los inhibidores de HDAC en las células RH4 y CADO-ES indican que las posibles modificaciones genéticas inducidas por estos compuestos a tiempos cortos no producen un efecto sensibilizador en las células a la muerte inducida por TRAIL, a excepción del ligero aumento de la sensibilidad a los LUV-TRAIL observada en las células RH4 tras 1 hora de estimulación con el inhibidor VPA.

Por lo tanto y a la vista de los resultados previamente expuestos, se quiso ampliar el estudio con los inhibidores de HDAC empleando periodos más largos de pre-incubación con los mismos para ver si de este modo las posibles modificaciones genéticas inducidas por dichos inhibidores podrían tener un efecto sensibilizador a la muerte inducida por TRAIL en las células RH4 y CADO-ES. Para ello se repitieron los ensayos en este caso con un tiempo de exposición inicial a los inhibidores de HDAC VPA y FK228 de 24 horas. Posteriormente, se añadió TRAIL en forma soluble o asociado a liposomas y se analizó la toxicidad tras 6 horas o tras 24 horas posteriores a la adición de TRAIL. Los resultados se muestran en la Figura 4.27.

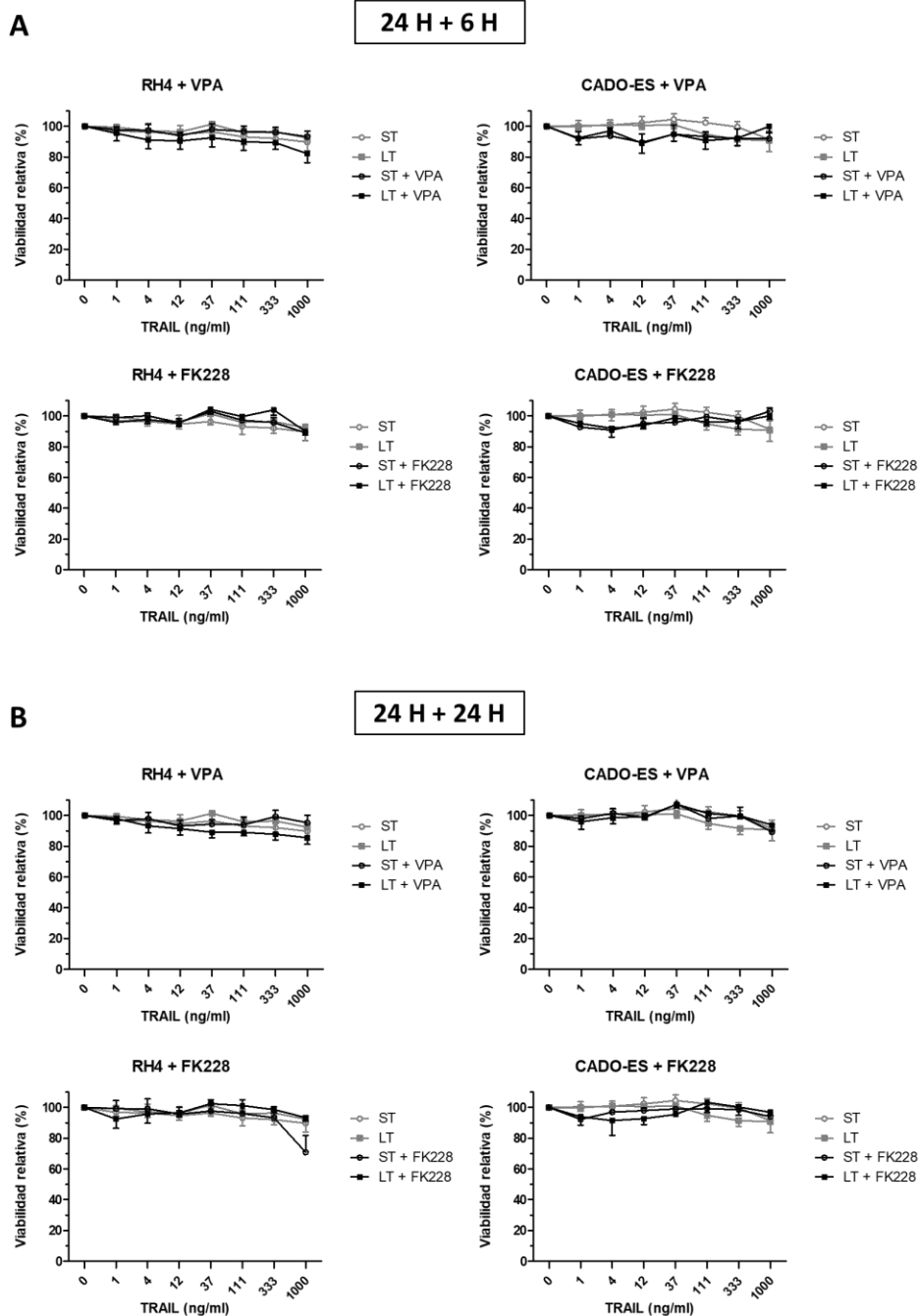


Figura 4.27 Análisis del efecto citotóxico de sTRAIL y LUV-TRAIL en células RH4 y CADO-ES tras el pre-tratamiento con inhibidores de HDAC a tiempos largos. Las células fueron pre-incubadas con VPA (RH4 a 1 mM y CADO-ES a 10 mM) y FK228 (RH4 a 5 μ M y CADO-ES a 100 μ M) durante 24 horas. Finalizada la pre-incubación se añadió sTRAIL (ST) y LUV-TRAIL (LT) a una dosis de 1 μ g/ml. Las células permanecieron un periodo de tratamiento de 6 horas (A) y 24 horas (B) tras el cual se analizó la viabilidad celular por MTT. Las gráficas muestran la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes.

La incubación de 24 horas con los agentes inhibidores de HDAC no reflejó ningún tipo de sensibilización a la citotoxicidad de TRAIL en los tiempos experimentales analizados tras la adición de sTRAIL y LUV-TRAIL en las líneas celulares RH4 y CADO-ES. Únicamente se observó un descenso en la resistencia al efecto de la proteína soluble cuando el periodo de incubación con TRAIL fue de 24 horas en las células RH4 tras la estimulación con el compuesto FK228, aunque el descenso de viabilidad relativa observado no es significativo.

Los experimentos realizados a diferentes tiempos de incubación de los inhibidores HDAC y el posterior tratamiento con TRAIL permiten concluir que las moléculas VPA y FK228 no proporcionan un efecto sensibilizante a la citotoxicidad inducida por TRAIL, tanto sTRAIL como LUV-TRAIL, en las líneas celulares RH4 y CADO-ES.

4.4 Efecto de la variación de la composición lipídica en la citotoxicidad de LUV-TRAIL

En estudios previos por parte de nuestro grupo, se demostró la capacidad de los liposomas “desnudos” (sin TRAIL anclado a la superficie) de potenciar y sensibilizar a la apoptosis inducida por TRAIL en determinadas líneas celulares. Este hecho permite utilizar el propio liposoma como posible agente sensibilizante a la muerte inducida por TRAIL. Aunque de forma estándar se han empleado LUV con una composición lipídica semejante a los exosomas fisiológicos con los ligandos mortales en superficie que secretan los linfocitos T activados, se quiso modificar la concentración relativa de cada componente de los liposomas para estudiar el potencial apoptótico de TRAIL anclado a su superficie en líneas celulares de sarcoma.

4.4.1 Efecto de la variación de la concentración de esfingomielina en la citotoxicidad de LUV-TRAIL

El primer candidato responsable de un posible efecto sensibilizador dentro de los LUV es la esfingomielina (SM). La SM es uno de los componentes principales de las balsas lipídicas y cuyas interacciones van a determinar la

estabilización de estas regiones como plataformas señalizadoras [396]. Teniendo en cuenta que los liposomas estándar presentan una concentración relativa de SM del 30% con respecto a la concentración lipídica total, se prepararon LUV con concentraciones de SM relativas del 0%, 60% y 80 % (Tabla 3.3). Una vez generados los distintos liposomas y tras su incubación con TRAIL soluble, se estudió la capacidad citotóxica de las nuevas formulaciones en líneas celulares de sarcoma.

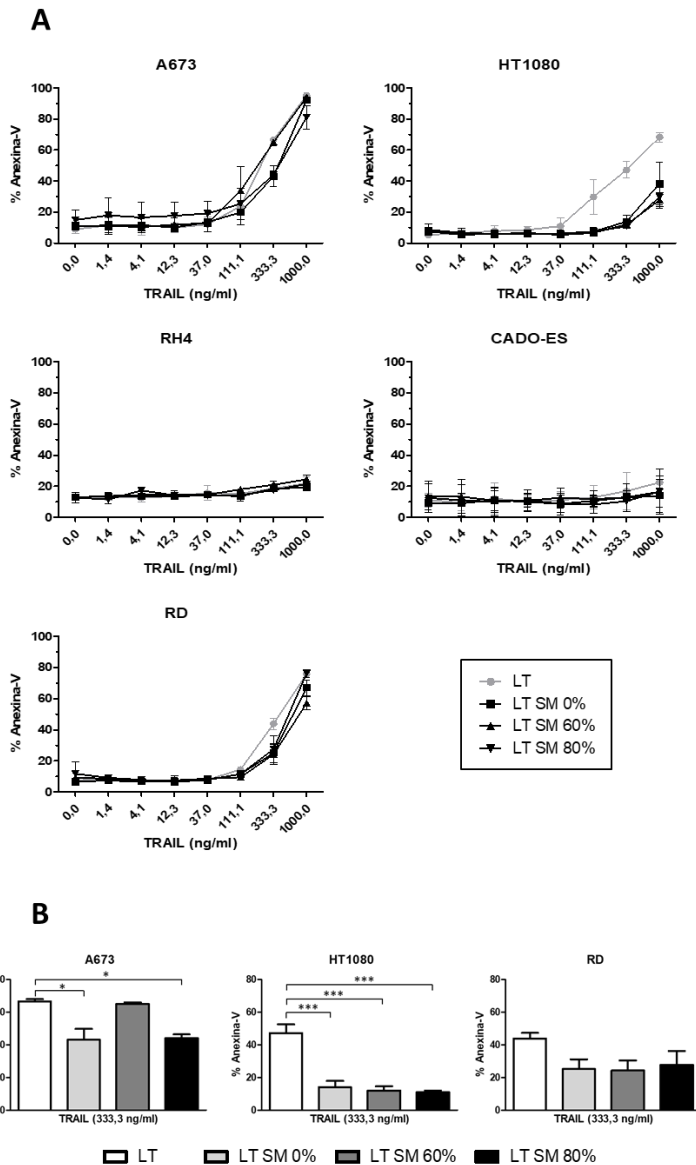


Figura 4.28 Citotoxicidad de LUV-TRAIL con distinta concentración de esfingomielinea en su composición sobre líneas celulares de sarcoma. A. Curvas dosis-respuesta del tratamiento con LUV-TRAIL y distintas formulaciones con concentración relativa de esfingomielinea del 0%, 60% y 80%, con un tiempo de incubación de 16 horas. **B.** Representación detallada en barras de la dosis correspondiente a 333,3 ng/ml de TRAIL de las curvas dosis-respuesta en las células sensibles a la apoptosis inducida por TRAIL. Las gráficas muestran la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes (* p <0,05, *** p <0,001, \pm 95%CI).

La Figura 4.28 (A) muestra como en ninguna de las cinco líneas celulares testadas se observó una mejora en la capacidad citotóxica de LUV-TRAIL al

aumentar la concentración relativa de SM en los liposomas. Si se analiza con detalle las dosis altas, en concreto la concentración de TRAIL correspondiente a 333,3 ng/ml mostrada en la Figura 4.28 (B) se observa como en las líneas celulares HT1080 y RD el cambio en la composición del SM con respecto a los liposomas clásicos produjo una respuesta citotóxica a LUV-TRAIL similar para las tres concentraciones de SM probadas, estando todas por debajo del valor citotóxico de los LUV-TRAIL clásicos. En el caso de la línea celular A673, la eliminación de la SM en la formulación del liposoma así como la composición en un 80% pareció desfavorecer significativamente la actividad apoptótica de TRAIL, mientras que el valor de SM del 60% tuvo un efecto citotóxico similar a los LUV-TRAIL clásicos. Con los datos obtenidos se puede concluir que la variación estudiada en la composición de SM en los liposomas no mejora, e incluso empeora, el efecto citotóxico de LUV-TRAIL en las líneas celulares de sarcoma estudiadas. Esta pérdida de capacidad citotóxica ya se observó a dosis intermedias de LUV-TRAIL con las mismas concentraciones relativas de SM en la línea celular Jurkat [367]. Las líneas celulares RH4 y CADO-ES presentaron completa resistencia a todas las formulaciones de LUV-TRAIL analizadas.

4.4.2 Efecto de la variación de la concentración de fosfatidilcolina en la citotoxicidad de LUV-TRAIL

Un estudio similar al anterior se llevó a cabo con otro lípido, componente natural de los exosomas fisiológicos e incluido en la composición lipídica de los LUV clásicos, la fosfatidilcolina (PC). La PC está presente en los liposomas clásicos en una concentración relativa del 55% con respecto a los lípidos totales. En este caso se descartó la preparación de LUV en ausencia de PC, dada la propiedad de establecer interacciones entre los otros dos componentes lipídicos SM y CHOL (colesterol), con la formación de agregados. Por ello, se generaron LUV con concentración relativa de PC del 5% y del 96%.

La hipótesis de una posible sensibilización a LUV-TRAIL mediante un aumento en la concentración de PC en los liposomas está fundamentada en estudios que demuestran cómo a través de la activación con determinados

fármacos de PPAR γ , diana de unión a PC, es posible superar la resistencia a la apoptosis inducida por TRAIL en determinadas líneas celulares [397-399].

Una vez generadas las distintas formulaciones de LUV-TRAIL con variación en la concentración relativa de PC en los LUV (Tabla 3.4), se procedió a realizar un estudio comparativo de su citotoxicidad en las líneas celulares de sarcoma. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.29.

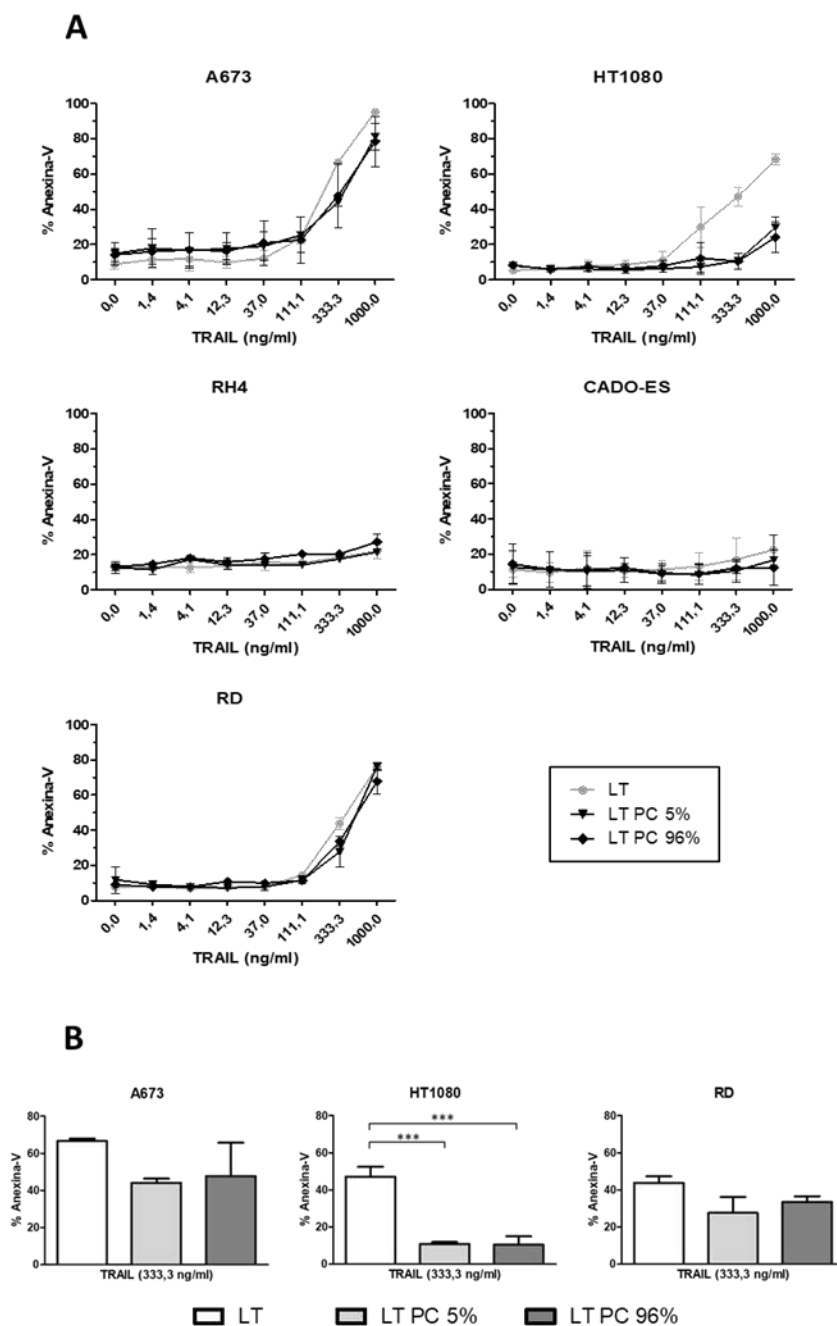


Figura 4.29 Citotoxicidad de LUV-TRAIL con distinta concentración de fosfatidilcolina en su composición sobre líneas celulares de sarcoma. A. Curvas dosis-respuesta del tratamiento con LUV-TRAIL y distintas formulaciones con concentración relativa de fosfatidilcolina del 5% y 96%, con un tiempo de incubación de 16 horas. **B.** Representación detallada en barras de la dosis correspondiente a 333,3 ng/ml de TRAIL de las curvas dosis-respuesta en las células sensibles a la apoptosis inducida por TRAIL. Las gráficas muestran la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes (***) p <0,001, \pm 95%CI).

Los datos obtenidos de los ensayos dosis-respuesta, mostrados en la Figura 4.29 (A), indicaron que en ninguna de las líneas celulares estudiadas se produjo un aumento en la capacidad apoptótica de LUV-TRAIL cuando se modificó la cantidad relativa de PC con respecto a los liposomas clásicos. Observando en detalle la concentración de TRAIL que mayor variación de citotoxicidad presentó (333,3 ng/ml de TRAIL) representada en la Figura 4.29 (B), se pudo constatar una disminución en la capacidad citotóxica de LUV-TRAIL cuando se modificó la concentración de PC, siendo un descenso muy significativo del efecto apoptótico con respecto a los LUV-TRAIL clásico en la línea celular HT1080. Nuevamente, las líneas celulares RH4 y CADO-ES fueron completamente resistentes a todas las formulaciones de LUV-TRAIL analizadas.

4.4.3 Efecto de la variación de la concentración de colesterol en la citotoxicidad de LUV-TRAIL

El colesterol (CHOL), además de ser un componente clave para el mantenimiento de la integridad y la correcta fluidez en las membranas lipídicas, es un componente esencial de las balsas lipídicas, contribuyendo de este modo a la regulación de la señalización apoptótica. Es por ello que se quiso estudiar el efecto citotóxico de LUV-TRAIL con distintas concentraciones relativas de CHOL y para ello se generaron LUV con una cantidad relativa de CHOL creciente de entre 20-50% (Tabla 3.5), además de los LUV clásicos que contienen un 10% en su composición.

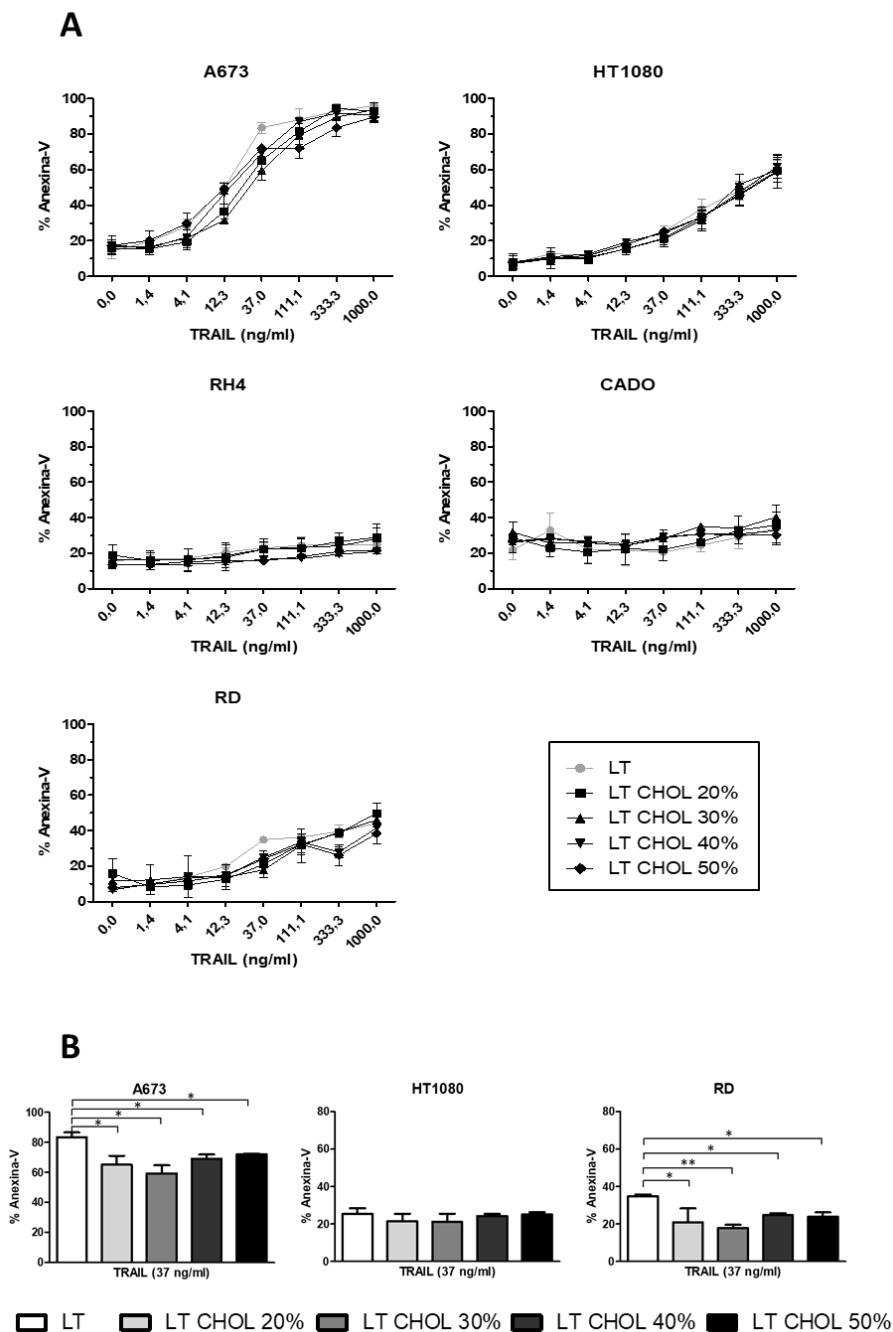


Figura 4.30 Citotoxicidad de LUV-TRAIL con distinta concentración de colesterol en su composición sobre líneas celulares de sarcoma. A. Curvas dosis-respuesta del tratamiento con LUV-TRAIL y distintas formulaciones con concentración relativa de colesterol del 20%, 30%, 40% y 50%, con un tiempo de incubación de 16 horas. **B.** Representación detallada en barras de la dosis correspondiente a 37 ng/ml de TRAIL de las curvas dosis-respuesta en las células sensibles a la apoptosis inducida por TRAIL. Las gráficas muestran la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes (* p <0,05, ** p <0,005, \pm 95%CI).

La citotoxicidad de las formulaciones de LUV-TRAIL con concentraciones crecientes de CHOL fue estudiada sobre distintas líneas celulares de sarcoma. Los datos obtenidos de ensayos dosis-respuesta se muestran en la Figura 4.30 (A), donde se observa que el perfil de citotoxicidad fue muy similar para las diferentes concentraciones de CHOL utilizadas en LUV-TRAIL a dosis máximas de TRAIL. Sin embargo, para dosis intermedias de TRAIL, como a la concentración de 37 ng/ml, mostrado en la Figura 4.30 (B), se observaron disminuciones significativas del potencial apoptótico de LUV-TRAIL cuando la concentración de CHOL aumentó con respecto a los liposomas clásicos en las líneas celulares A673 y RD. Por el contrario, no se observaron cambios en la citotoxicidad de la línea celular HT1080. Las células RH4 y CADO-ES una vez más, permanecieron resistentes a todas las formulaciones de LUV-TRAIL estudiadas.

4.4.4 Efecto de la adición de edelfosina en la citotoxicidad de LUV-TRAIL

La edelfosina (ET-18-OCH₃), EDF) es un lípido sintético perteneciente al grupo de análogos alquil-lisofosfolípidos (ALPs), reconocidos como nuevos agentes anti-neoplásicos debido a su capacidad pro-apoptótica selectiva en células transformadas [364, 400, 401]. A diferencia de otros agentes anti-tumorales, la diana de actuación de este lípido éter anti-tumoral con elevada estabilidad metabólica no es el DNA celular sino la membrana plasmática. Su analogía con la PC produce la inhibición de la biosíntesis de ésta, favoreciendo la acumulación del compuesto en las balsas lipídicas y con ello el entrecruzamiento de receptores, siendo capaz de activar la señalización apoptótica independiente de ligando [364].

Debido al potencial apoptótico de la EDF, su incorporación a la estructura del liposoma podría potenciar el efecto citotóxico de LUV-TRAIL, optimizando así el tratamiento con la molécula. Esta hipótesis se estudió con anterioridad, por parte de nuestro grupo, sobre líneas celulares de cáncer de mama [367]. En el presente trabajo se ha ampliado el estudio del efecto de la EDF sobre las líneas celulares de sarcoma.

Para la generación de los liposomas con EDF, llamados LUV-EDF, se tuvo que tener en cuenta el factor de la composición. Dado que la incorporación de EDF en la formulación de los LUV supone modificar su composición, se decidió eliminar por completo el lípido SM dado que presenta mayor variabilidad en la citotoxicidad cuando se modifica su concentración en las líneas celulares estudiadas. Así pues, manteniendo la concentración constante de CHOL y DOGS-NTA-Ni y modificando la concentración de PC, se incorporó la EDF a distintas concentraciones en un rango de 60-480 μM (Tabla 3.6). La incubación de LUV-EDF con TRAIL soluble generó los denominados LUV-EDF-TRAIL. También se prepararon liposomas con EDF en ausencia de DOGS-NTA-Ni (LUV-EDF.0) para el estudio combinatorio del efecto citotóxico con las distintas formas de TRAIL (soluble o asociada a liposomas), asegurándose así la ausencia de posibles interacciones que produzcan la unión de TRAIL a los liposomas durante el proceso experimental.

Una vez generadas todas las nuevas fórmulas de LUV con EDF, se procedió a estudiar la posible sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL siguiendo varias aproximaciones experimentales en líneas celulares de sarcoma. En primer lugar se estudió la capacidad citotóxica de LUV-EDF y LUV-EDF-TRAIL (con dosis crecientes de EDF en la composición del liposoma) en comparación con los LUV-TRAIL clásicos en las líneas celulares A673, HT1080, RH4, CADO-ES y RD. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.31.

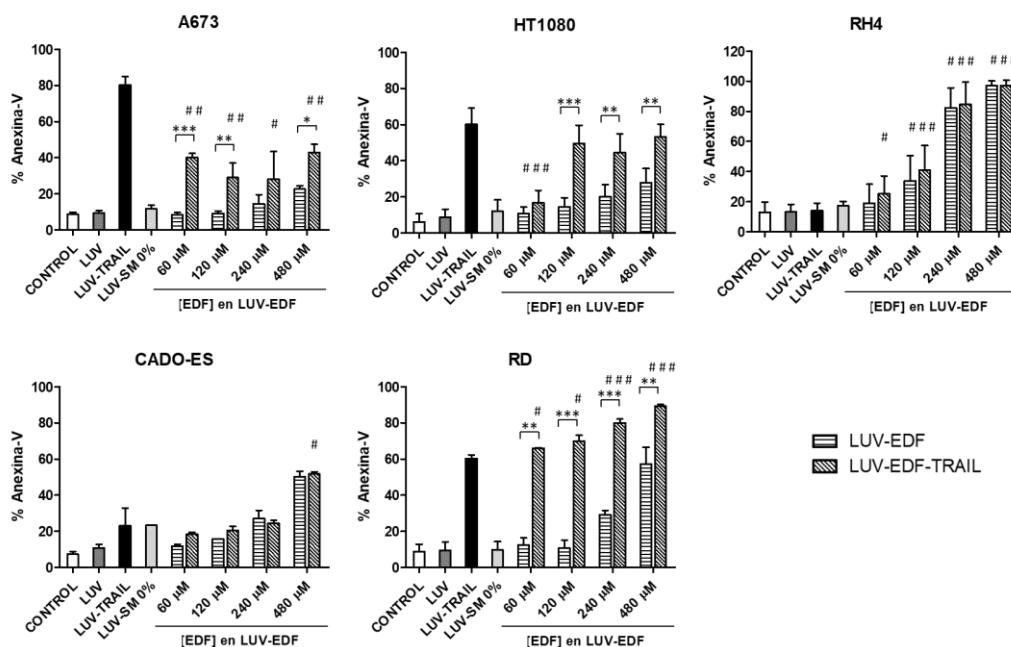


Figura 4.31 Citotoxicidad de LUV-EDF y LUV-EDF-TRAIL, con distintas concentraciones de EDF en su composición, sobre las líneas celulares A673, HT1080, RH4, CADO-ES y RD. Las células se trataron con LUV-EDF, a concentraciones crecientes de EDF, con y sin TRAIL asociado a la superficie. La concentración final de TRAIL, en su caso, fue de 1 µg/ml para todas las líneas celulares salvo A673, que dada su elevada sensibilidad a TRAIL se empleó la dosis de 300 ng/ml, con un tiempo de incubación de 16 horas en todos los casos. Como control, las células también se trataron con LUV, LUV-TRAIL y LUV-SM 0%. Las gráficas muestran la media±SD de al menos tres experimentos independientes. Los asteriscos muestran la significación entre LUV-EDF con y sin TRAIL en la molécula (* $p<0,05$, ** $p<0,005$, *** $p<0,001$, $\pm 95\%CI$). Las almohadillas muestran la significación entre LUV-EDF-TRAIL y LUV-TRAIL (# $p<0,05$, ## $p<0,005$, ### $p<0,001$, $\pm 95\%CI$).

En contra de lo esperado, se observó que en las líneas celulares A673 y HT1080, la incorporación de EDF en la formulación del liposoma produjo un bajo efecto citotóxico, sin superar el 30% de muerte celular para la concentración máxima de EDF. Además, cuando se combinó con TRAIL en superficie, la EDF afectó negativamente a la citotoxicidad con respecto a los LUV-TRAIL clásicos, siendo un efecto negativo muy pronunciado en las células A673 para todas las dosis de EDF analizadas y para la menor dosis de EDF en las células HT1080. En el caso de las células RH4 y CADO-ES, caracterizadas por ser resistentes a la apoptosis inducida por TRAIL, se observó un efecto citotóxico dosis-dependiente de forma equivalente para ambas formulaciones con EDF, esto es LUV-EDF y LUV-EDF-TRAIL, no habiendo ninguna diferencia significativa entre ambas, lo que

indicó que TRAIL (como es lo esperado en estas líneas celulares resistentes a TRAIL) no tuvo ningún efecto en la muerte celular producida por LUV-EDF y LUV-EDF-TRAIL. Resultó interesante que las células RH4 presentaron una alta y similar sensibilidad tanto a los LUV-EDF como a LUV-EDF-TRAIL, llegando a unos porcentajes de muerte cercanos al 100% a la dosis máxima de EDF. Finalmente, en las células RD se observó un efecto sinérgico entre TRAIL y EDF cuando se combinaron en el liposoma, mejorando la citotoxicidad de forma muy significativa con respecto a los LUV-TRAIL clásicos.

Por otra parte, se quiso estudiar el efecto de la combinación de LUV-EDF junto con las distintas formas de TRAIL con el objetivo de comprobar si la combinación de EDF y TRAIL en formulaciones distintas tienen un efecto potenciador de la citotoxicidad de los mismos por separado. Para ello se seleccionaron los LUV-EDF con concentraciones de EDF intermedias y en ausencia del lípido quelante (LUV-EDF.0). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.32.

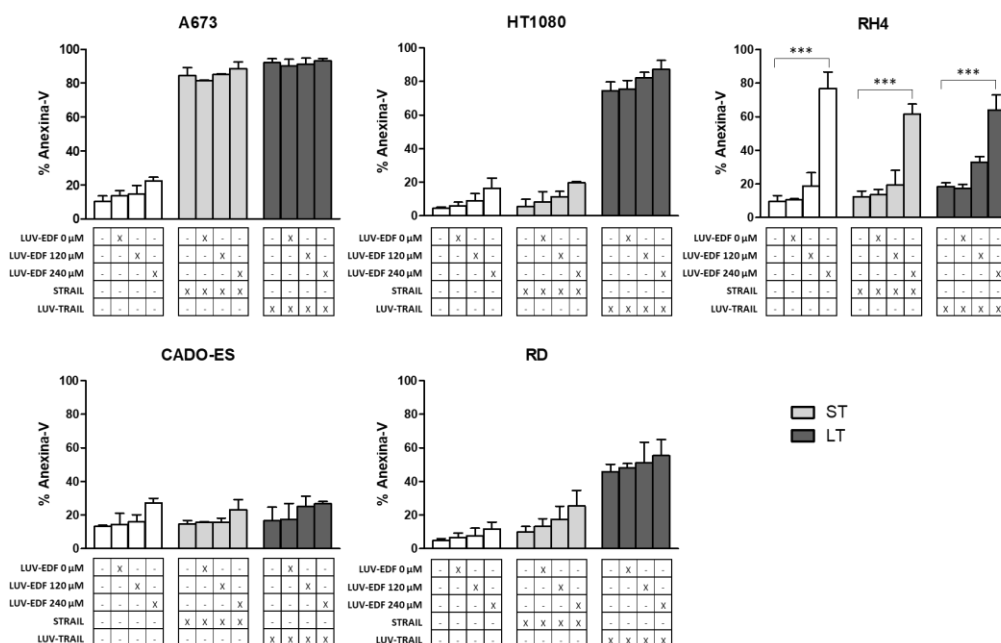


Figura 4.32 Citotoxicidad de LUV-EDF en combinación con sTRAIL y LUV-TRAIL sobre las líneas celulares A673, HT1080, RH4, CADO-ES y RD. Las células se trataron con LUV-EDF, a concentraciones de EDF de 0, 120 y 240 μ M, en combinación con TRAIL soluble (ST) o LUV-TRAIL (LT). La concentración final de TRAIL fue de 1 μ g/ml para todas las líneas celulares salvo para A673, que dada su elevada sensibilidad a TRAIL se empleó la dosis de 300 ng/ml, con un tiempo de incubación de 16 hoas en todos los casos. Las gráficas muestran la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes. (***) $p < 0,001$, $\pm 95\%$ CI).

Al igual que lo observado en el experimento anterior, EDF presentó baja toxicidad en las células A673 y HT1080, donde se observa que la adición de forma independiente de LUV-EDF.0 y TRAIL generó unos valores de muerte celular aproximadamente equivalentes a la suma del efecto citotóxico de los dos agentes por separado, sin detectarse una potenciación de la capacidad citotóxica de EDF y TRAIL (en su forma soluble y asociada a liposomas) tras la combinación de los mismos. En las células RH4, LUV-EDF.0 con una concentración de EDF de 240 μ M presentó una elevada citotoxicidad que no se vio apenas afectada por la combinación de TRAIL (tanto sTRAIL como LUV-TRAIL). Por otro lado, las células CADO-ES permanecieron resistentes a LUV-EDF.0, manteniendo un perfil de citotoxicidad similar tras la administración de TRAIL (sTRAIL y LUV-TRAIL), lo que demuestra la ausencia de sinergia en el efecto citotóxico de la combinación. Sin embargo, las células RD fueron las únicas que presentaron una sinergia en la

citotoxicidad de LUV-EDF tras la adición de sTRAIL y LUV-TRAIL, aunque sin mostrar una potenciación del efecto citotóxico de EDF y TRAIL en la administración de forma separada.

Dada la variedad de resultados obtenidos sobre todas las líneas celulares estudiadas, se seleccionaron las células RH4 y RD para estudiar más en profundidad el mecanismo subyacente a la citotoxicidad de LUV-EDF con TRAIL. Se escogieron las células RH4 dada su alta resistencia a TRAIL y sensibilidad a LUV-EDF y las células RD por su sinergia entre EDF y TRAIL. También se seleccionó una concentración de EDF intermedia, correspondiente a 120 μ M. En el primer experimento, las células se trataron con diversos inhibidores (anticuerpo bloqueante de TRAIL, inhibidores de caspasas, inhibidor de la necroptosis y bloqueante de la endocitosis dependiente de dinamina) y tras su correspondiente tiempo de incubación, se añadieron LUV-EDF y LUV-EDF-TRAIL con el objetivo de estudiar el mecanismo de muerte celular inducido por estas formulaciones liposomales con EDF. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 4.33.

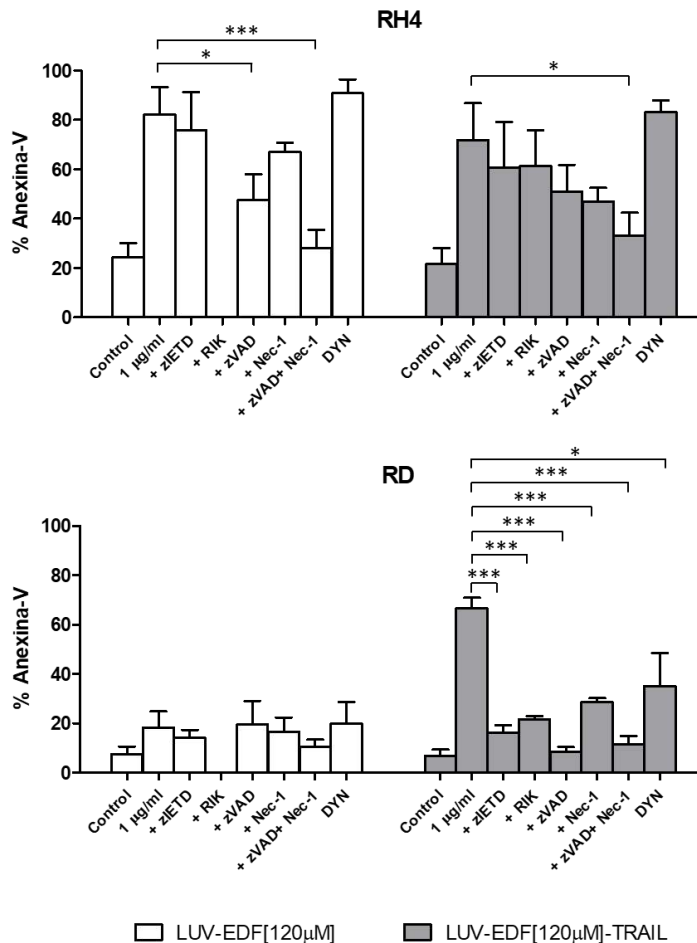


Figura 4.33 Caracterización de la muerte celular inducida por LUV-EDF y LUV-EDF-TRAIL en las líneas celulares RH4 y RD. Las células fueron tratadas con LUV-EDF y LUV-EDF-TRAIL a una concentración máxima de EDF y TRAIL correspondiente a 5 µM y 1 µg/ml respectivamente, durante un periodo de tiempo de 16 horas. Además, las células fueron pre-incubadas durante 1 hora con el inhibidor específico de caspasa-8 z-IETD-fmk (zIETD, 30 µM), el anticuerpo bloqueante de TRAIL RIK (500 ng/ml), el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk (zVAD, 30 µM), el inhibidor de necroptosis necrostatina-1 (Nec-1, 30 µM) y el inhibidor de dinamina dynasore (DYN, 80 µM). Las gráficas muestran la media±SD de al menos tres experimentos independientes (* $p<0,05$, *** $p<0,001$, ±95%CI).

Las células RH4 presentaron una citotoxicidad de alrededor del 80% para la formulación LUV-EDF. La muerte inducida tanto por LUV-EDF como por LUV-EDF-TRAIL es parcialmente dependiente de caspasas ya que la pre-incubación con el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk inhibió en parte dicha muerte celular. Sin embargo, la vía extrínseca de la apoptosis parece tener una escasa contribución a la muerte celular ya que el inhibidor específico de caspasa-8 z-

IETD-fmk, tanto en el caso de LUV-EDF como en LUV-EDF-TRAIL, así como el anticuerpo bloqueante de TRAIL, RIK en el caso de LUV-EDF-TRAIL apenas afectaron a la inducción de la muerte celular en la línea RH4. Además, tanto para LUV-EDF como para LUV-EDF-TRAIL, la pre-incubación conjunta con los inhibidores z-VAD-fmk y Nec-1 llegó prácticamente a restaurar la muerte celular a niveles basales, lo que indica que en el proceso de muerte celular inducido tanto por LUV-EDF como por LUV-EDF-TRAIL en las células RH4, hay contribución de las caspasas así como un proceso de necroptosis. Finalmente, la citotoxicidad inducida por ambas formulaciones liposomales con EDF en las células RH4 es un proceso independiente de la endocitosis dependiente de dinamina ya que la pre-incubación con el inhibidor de dinamina dynasore no modificó la muerte celular inducida por LUV-EDF o LUV-EDF-TRAIL.

La línea celular RD presentó unos niveles de muerte celular muy bajos cuando se trataron con LUV-EDF, alcanzando un máximo del 20%. Dado que el nivel de muerte celular inducido por LUV-EDF es tan bajo, la pre-incubación con los distintos inhibidores (z-VAD-fmk, z-IETD-fmk, necrostatina-1 y dynasore) no resulta valorable. Sin embargo, en el caso del tratamiento con LUV-EDF-TRAIL se observó una muerte celular que alcanzó el 70%. En este caso, la muerte celular fue totalmente dependiente de caspasas ya que la pre-incubación con el inhibidor general de caspasa z-VAD-fmk bloqueó totalmente la muerte inducida por LUV-EDF-TRAIL. Además, en el caso de las células RD, la vía extrínseca a través de TRAIL es la vía apoptótica que contribuye fundamentalmente a la muerte celular inducida por LUV-EDF-TRAIL ya que el inhibidor específico de caspasa-8 z-IETD-fmk así como el anticuerpo bloqueante de TRAIL, RIK inhibieron casi completamente citotoxicidad de LUV-EDF-TRAIL. Finalmente, la pre-incubación con el inhibidor dynasore inhibió parcialmente la muerte inducida por LUV-EDF-TRAIL en las células RD, lo que evidencia que la incorporación de LUV-EDF-TRAIL a través del mecanismo de endocitosis dependiente de dinamina está implicado en el proceso de muerte celular inducida por éstos en las células RD.

4.5 Encapsulación de agentes sensibilizantes en el interior de LUV-TRAIL

La encapsulación de compuestos dentro de liposomas es un mecanismo muy común usado en farmacología, ya que presenta ventajas frente a la administración directa del compuesto en forma libre. La vehiculización a través de nanopartículas lipídicas mejorara el perfil farmacocinético de los compuestos así como la disminución de efectos secundarios al optimizar la concentración local del agente farmacológico [294, 314, 402].

En el trabajo expuesto hasta ahora, el empleo de las nanopartículas lipídicas estaba enfocado a hacer de plataforma para el anclaje de TRAIL a su superficie, mejorando así su capacidad de inducir apoptosis. Sin embargo, es posible explotar aún más las aplicaciones de los liposomas utilizándolos a su vez como mecanismo de vehiculización de agentes que sensibilicen o actúen en sinergia con TRAIL.

En trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación, se llevó a cabo el desarrollo con éxito del protocolo de encapsulación del compuesto doxorrubicina [403], mediante el método de gradiente de pH [365, 366]. Siguiendo este ejemplo, se quiso implementar del mismo modo la encapsulación del agente sensibilizante flavopiridol, dado los prometedores resultados obtenidos en los estudios combinatorios de este compuesto con el ligando mortal TRAIL, y porque comparte características semejantes con la doxorrubicina que posibilitan su encapsulación (Apartado 4.2).

4.5.1 Encapsulación de flavopiridol en LUV-TRAIL y estudio de su potencial citotóxico

La encapsulación del compuesto flavopiridol en los LUV, al igual que para la encapsulación de doxorrubicina, se llevó a cabo mediante el método de gradiente de pH, siendo en este caso el ratio molar droga/lípido de 1/1,9. De esta forma, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado de Materiales y

Métodos (Apartado 3.2.4.5) se intentó generar una nueva formulación liposomal con flavopiridol en su interior, denominada LUV-FVP.

En primer lugar, se caracterizó la eficiencia del proceso de encapsulación de flavopiridol llevado a cabo para la generación de LUV-FVP. Para ello, la incubación con flavopiridol se realizó a diferentes tiempos con dos tipos de liposomas en paralelo, LUV-AS CHOL y LUV-PBS CHOL, este último como control negativo al contener en su interior PBS en lugar de AS, careciendo así de gradiente de pH para la entrada y retención de flavopiridol. La incorporación de colesterol (CHOL) en la composición del liposoma se debió a que se ha descrito que la presencia de este lípido ofrece una cierta ventaja en la encapsulación del compuesto [368]. Una vez alcanzados los periodos de incubación establecidos, se separó el flavopiridol libre no encapsulado de la fracción liposomal de cada muestra y tras la lisis de los liposomas, se midió por espectrofotometría los valores de absorbancia del compuesto encapsulado. La cuantificación de flavopiridol encapsulado se realizó mediante la extrapolación de los valores de absorbancia sobre una recta patrón de absorbancia-concentración de flavopiridol realizada en paralelo (Figura 4.34).

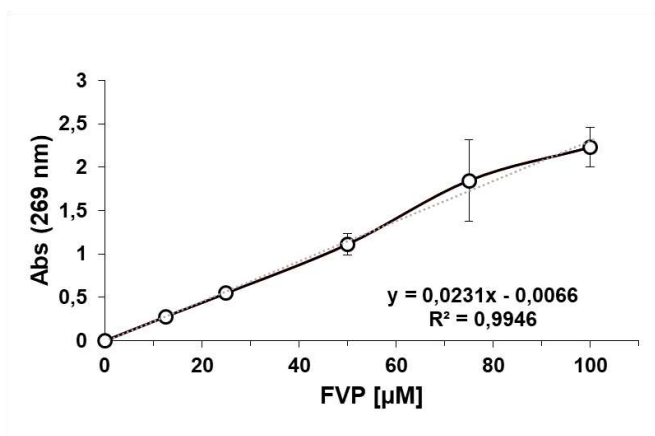


Figura 4.34 Recta patrón de la concentración de flavopiridol. Representación de la concentración de flavopiridol en función de los valores de absorbancia medidos a 269 nm. La gráfica muestra la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes.

Asimismo, se midió la eficiencia de retención del flavopiridol una vez encapsulado en LUV-FVP. Para ello, las muestras de LUV-AS CHOL incubadas con flavopiridol durante 30 minutos se dispusieron a 37 °C durante periodos de 2, 6 y 24 horas. Posteriormente, se procedió a la cuantificación de flavopiridol presente en el interior del liposoma a los tiempos indicados. Los valores obtenidos se expresaron en tanto por ciento en relacionaron con la concentración inicial de flavopiridol presente en el momento final del proceso de encapsulación. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.35.

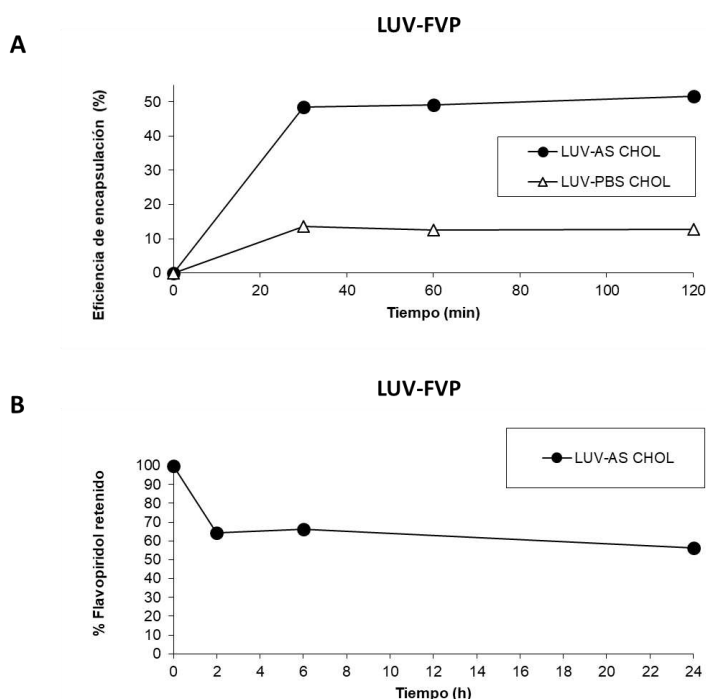


Figura 4.35 Eficiencia de encapsulación y eficiencia de retención de flavopiridol en LUV-AS COL. **A.** Flavopiridol fue incubado con LUV-AS CHOL y LUV-PBS CHOL en un ratio molar de 1/1,9 (droga:lipido) a 60 °C y 750 rpm a tiempos de 30, 60 y 120 minutos. Tras los periodos de incubación, el flavopiridol no encapsulado se separó de la fracción lisosomal. El flavopiridol encapsulado fue cuantificado por absorbancia a 269 nm e interpolado en la curva estándar de flavopiridol. La eficiencia de encapsulación representa el porcentaje total de flavopiridol encapsulado en la fracción liposomal. **B.** LUV-AS CHOL encapsulados con flavopiridol tras una incubación de 30 minutos permanecieron a 37 °C durante 2, 6 y 24 horas. Finalizados los tiempos indicados, se separó la fracción de flavopiridol liberada y se midió la cantidad de flavopiridol retenida en la fracción liposomal. Los datos se representan en porcentaje con respecto a la cantidad de flavopiridol encapsulada al tiempo inicial.

La Figura 4.35 muestra una rápida encapsulación del compuesto flavopiridol cuando se incubó con LUV-AS CHOL, alcanzándose el máximo de eficiencia de encapsulación a los 30 minutos y permaneciendo constante en los tiempos posteriores de incubación analizados. La eficiencia de encapsulación obtenida con LUV-AS CHOL, aunque no elevada, alcanzó valores del 50% con la metodología desarrollada. Esto se traduce en una concentración final de flavopiridol en el interior del lumen de LUV-AS CHOL de aproximadamente 175 μM , ya que la incubación de LUV con flavopiridol se realizó con una concentración inicial de 350 μM . Por otra parte, la eficiencia de encapsulación de flavopiridol en el interior de LUV-PBS CHOL fue muy reducida alcanzando sólo el 10%.

Por otro lado, la eficiencia de retención tras el proceso de encapsulación indicó una salida de flavopiridol encapsulado de aproximadamente el 40% de la cantidad inicial encapsulada tras un periodo de 2 horas de incubación, manteniéndose constante en el tiempo hasta las 24 horas.

A la vista de los datos obtenidos en el experimento de caracterización del proceso de encapsulación se pudo concluir que la metodología de encapsulación de flavopiridol en LUV-AS CHOL no presentó óptimos parámetros de eficiencia de encapsulación y de retención, evidenciando la necesidad de generar nuevos LUV-FVP para cada experimento, con el objetivo de no perder potencial citotóxico.

Tras la caracterización inicial de LUV-FVP, se procedió a acoplar TRAIL a la superficie de los mismos a una concentración de 12 $\mu\text{g/ml}$, generando así los denominados LUV-FVP-TRAIL. Para ello se utilizó la misma metodología empleada con los LUV clásicos y con los LUV encapsulados con doxorubicina, que se detalla en la sección de Materiales y Métodos (Apartado 3.2.4.5). Aunque los resultados previos indicaban que la eficiencia de encapsulación máxima de flavopiridol en el lumen de los liposomas se obtuvo tras los 30 min de incubación, se quiso analizar el potencial citotóxico de LUV-FVP-TRAIL con los diferentes tiempos de encapsulación con flavopiridol. Para ello, se incubaron liposomas del tipo LUV-AS CHOL con flavopiridol a los tiempos de 30, 60 y 120 minutos a los que posteriormente se les ancló TRAIL a la superficie generando diferentes

formulaciones de LUV-FVP-TRAIL. En paralelo se utilizaron LUV-PBS CHOL incubados con flavopiridol a los mismos tiempos y sometidos a la posterior unión de TRAIL a la superficie como control negativo de encapsulación. También se incluyeron puntos experimentales con controles de muerte celular de los diferentes liposomas empleados en el experimento sin flavopiridol en su interior ni TRAIL en su superficie, así como de LUV-TRAIL. Con objetivo de comprobar si el potencial citotóxico de la formulación LUV-FVP-TRAIL es generado por la combinación de flavopiridol y TRAIL en la misma composición liposomal o, por el contrario, es equivalente al efecto citotóxico producido por la combinación de TRAIL y flavopiridol en estructuras liposomales independientes, se incluyó el tratamiento combinado de LUV-FVP y LUV-TRAIL. La capacidad citotóxica de LUV-FVP-TRAIL junto con la de LUV-FVP se analizó sobre las líneas celulares HT1080 y RD, tras un periodo de tratamiento de 16 horas. Los resultados del potencial citotóxico de las diferentes versiones generadas de LUV-FVP y LUV-FVP-TRAIL se muestran en la Figura 4.36.

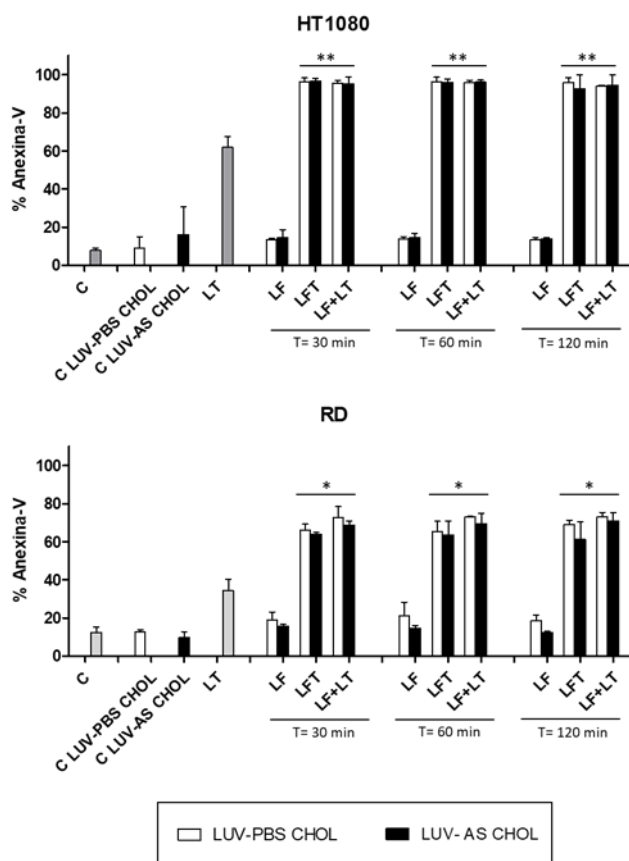


Figura 4.36 Análisis de la citotoxicidad de LUV-FVP y LUV-FVP-TRAIL con variaciones en el periodo de encapsulación con flavopiridol sobre las líneas celulares de sarcoma HT1080 y RD. Las células se trataron con LUV-FVP (LF) y LUV-FVP-TRAIL (LFT) generados con liposomas de tipo LUV-PBS CHOL y LUV-AS CHOL en periodos de incubación con flavopiridol de 30, 60 y 120 minutos, así como con la combinación de LUV-FVP y LUV-TRAIL (LF+LT). Las concentraciones de TRAIL empleadas fueron de 1 $\mu\text{g/ml}$. Tras 16 horas de incubación, se analizó la muerte celular mediante marcaje con anexina-V, por citometría de flujo. Las gráficas muestran la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Los asteriscos reflejan la significación con respecto a LUV-TRAIL (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, $\pm 95\%$ CI).

Las células HT1080 y RD mostraron un perfil de respuesta a la citotoxicidad de LUV-FVP, LUV-FVP-TRAIL y la combinación de LUV-FVP y LUV-TRAIL equivalente. Sorprendentemente, los diferentes tipos de liposomas empleados no influyeron en el potencial citotóxico de las formulaciones de LUV-FVP y LUV-FVP-TRAIL generadas, presentando las diferentes variantes la misma capacidad citotóxica. Del mismo modo, los diferentes tiempos de incubación en el proceso de encapsulación tampoco supusieron una variación en la citotoxicidad de las distintas formulaciones de LUV-FVP y LUV-FVP-TRAIL empleadas. En las

dos líneas celulares analizadas, la citotoxicidad que mostraron LUV-FVP fue muy baja, no llegando a superar el 25% de muerte celular en ningún caso. Por el contrario, LUV-FVP-TRAIL y la combinación de LUV-FVP y LUV-TRAIL mostraron un potencial citotóxico equivalente, alcanzando una muerte celular del 100% en las células HT1080 y aproximadamente del 70% en el caso de las células RD. Además, ambos tratamientos presentaron diferencias significativas con respecto al efecto citotóxico del tratamiento con LUV-TRAIL en las dos líneas celulares, siendo las células HT1080 las que mayor valor de significación mostraron.

Teniendo en cuenta la eficiencia de encapsulación, correspondiente al 10% para LUV-PBS CHOL y 50% para LUV-AS CHOL, y el porcentaje de retención, que desciende drásticamente a las 2 horas hasta alcanzar un 60%, las concentraciones estimadas a las que se encuentra flavopiridol en la formulación LUV-FVP corresponderían a 21 μM y 105 μM respectivamente para LUV-PBS CHOL y LUV-AS CHOL. En base a ello, la concentración de flavopiridol equivalente a la incubación con 1 $\mu\text{g/ml}$ de TRAIL en las formulaciones LUV-FVP correspondería aproximadamente a 8,74 μM para LUV-AS CHOL y 1,75 μM en el caso de LUV-PBS CHOL. Estas concentraciones están muy por encima de la dosis sub-tóxica de flavopiridol en las líneas celulares HT1080 y RD por lo que, aunque la eficiencia de encapsulación y el porcentaje de retención de flavopiridol en LUV-PBS CHOL se consideren bajos, la concentración de flavopiridol en estos liposomas parece ser suficiente para inducir citotoxicidad en combinación con TRAIL.

4.5.2 Encapsulación de doxorrubicina en LUV-TRAIL y estudio de su potencial citotóxico

La encapsulación de drogas liposomales es un proceso desarrollado desde hace décadas y descrito en la literatura científica [294, 314, 365, 366]. En el caso de doxorrubicina, el método aplicado consiste en la creación de un gradiente de pH entre ambos lados de la bicapa lipídica del liposoma, que permite la libre entrada de doxorrubicina al interior del lumen y la precipitación de la

misma, quedando retenida de forma estable a lo largo del tiempo. El protocolo se describe al detalle en el apartado de Materiales y Métodos (Apartado 3.2.4.4).

La encapsulación de doxorubicina en los LUV permitió la obtención de dos nuevas formulaciones de liposomas: LUV con doxorubicina en su interior (LUVDOX) y LUV con doxorubicina en su interior y TRAIL acoplado a la superficie (LUVDOX-TRAIL).

El potencial citotóxico de las formulaciones LUVDOX y LUVDOX-TRAIL ya fue estudiado por miembros de nuestro grupo de investigación en un panel amplio de líneas celulares tumorales de mama, pulmón y colon [403], en los que se observó un significativo incremento de la capacidad apoptótica de TRAIL en presencia de doxorubicina encapsulada en el liposoma. Es por ello que el presente trabajo quiso incluir en el análisis el estudio comparativo de la citotoxicidad de los diferentes compuestos generados sobre líneas celulares de sarcoma. Para ello, las células se incubaron con las diferentes formulaciones de LUV a concentraciones crecientes de TRAIL y/o doxorubicina durante 24 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.37.

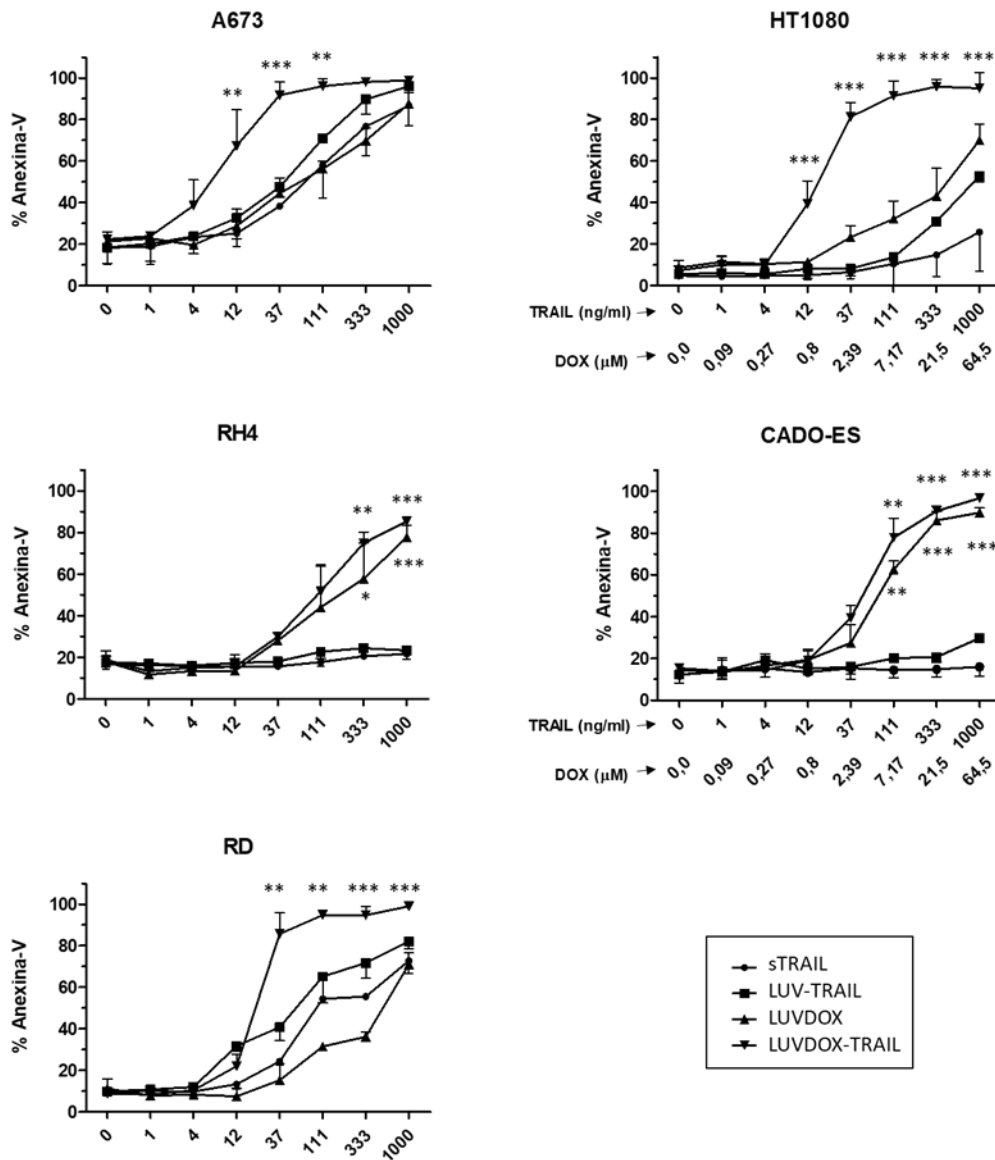


Figura 4.37 Citotoxicidad de LUVDOX-TRAIL en líneas celulares de sarcoma. Las células A673, HT1080, RH4, CADO-ES y RD fueron tratadas con TRAIL soluble, LUV-TRAIL, LUVDOX y LUVDOX-TRAIL a diferentes concentraciones de TRAIL (0-1000 ng/ml) y/o doxorrubicina (0-64,5 μ M) en su formulación. Tras 24 horas de incubación, se analizó la muerte celular mediante marcaje con anexina-V, por citometría de flujo. Las gráficas muestran la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Los asteriscos reflejan la significación con respecto a LUV-TRAIL (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001, \pm 95%CI).

En la Figura 4.37 se puede observar como la línea celular A673 presentó un perfil de citotoxicidad equivalente para TRAIL soluble, LUV-TRAIL y LUVDOX,

alcanzando una muerte celular de entorno al 100% a las dosis máximas. El compuesto LUVDOX-TRAIL incrementó muy significativamente la muerte celular con respecto a LUV-TRAIL cuando se emplearon las dosis más bajas, llegando prácticamente al máximo de citotoxicidad a una concentración de 37 ng/ml de TRAIL y 2,39 μ M de doxorubicina.

En la línea celular HT1080 LUVDOX-TRAIL presentó una curva de citotoxicidad similar alcanzando valores de muerte celular superiores al 80% de células a la misma concentración de 37 ng/ml de TRAIL y 2,39 μ M de doxorubicina, siendo diferencias muy significativas con respecto a la muerte inducida por LUV-TRAIL a la dosis equivalente de TRAIL.

También en las células HT1080, la formulación LUVDOX mejoró ligeramente el potencial citotóxico de LUV-TRAIL, sin llegar a suponer variaciones significativas, pero alcanzando valores del 70% de muerte celular.

Respecto a las células RH4 y CADO-ES, resistentes a la muerte inducida por TRAIL, respondieron de forma similar a los nuevos compuestos con doxorubicina encapsulada. En ambos casos, las curvas de LUVDOX y LUVDOX-TRAIL parecen solaparse, alcanzando valores superiores al 80% de muerte celular a las concentraciones máximas de liposomas en las dos líneas celulares.

Finalmente, las células RD tuvieron una gran sensibilidad a la muerte inducida por LUVDOX-TRAIL, que como se ha observado en las líneas celulares A673 y HT1080, también presentó variaciones muy significativas con respecto a la apoptosis inducida por LUV-TRAIL a concentraciones bajas de liposomas. Por el contrario, la citotoxicidad de la formulación LUVDOX presentó unos valores más bajos que los obtenidos con el tratamiento de LUV-TRAIL a dosis intermedias.

El análisis de todos los datos anteriores permite concluir que la combinación de doxorubicina encapsulada en el interior de LUV-TRAIL incrementa de forma muy significativa la inducción de apoptosis a concentraciones bajas con respecto a LUV-TRAIL, en todas las líneas celulares de sarcoma estudiadas. En el caso de las líneas resistentes a TRAIL (RH4 y

CADO-ES), esta mejora en el potencial apoptótico se debe principalmente al efecto de la doxorrubicina encapsulada en los liposomas, ya que las formulaciones LUVDOX y LUVDOX-TRAIL presentaron una respuesta equivalente sobre las células.

Una hipótesis factible que explique la elevada capacidad citotóxica de LUVDOX-TRAIL, frente a las demás formulaciones del ligando mortal estudiadas, es el mayor potencial de activación de las caspasas, y con ello, la eficiente ejecución de la ruta apoptótica. Para validar dicha hipótesis, se diseñó un experimento de análisis de la activación de las principales proteínas implicadas en la vía apoptótica extrínseca mediante la técnica *Western blot*, comparando el efecto en dichas proteínas de los tratamientos con TRAIL soluble, LUV-TRAIL, LUVDOX y LUVDOX-TRAIL sobre las líneas celulares de sarcoma HT1080 y RD a un tiempo corto de 8 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.38.

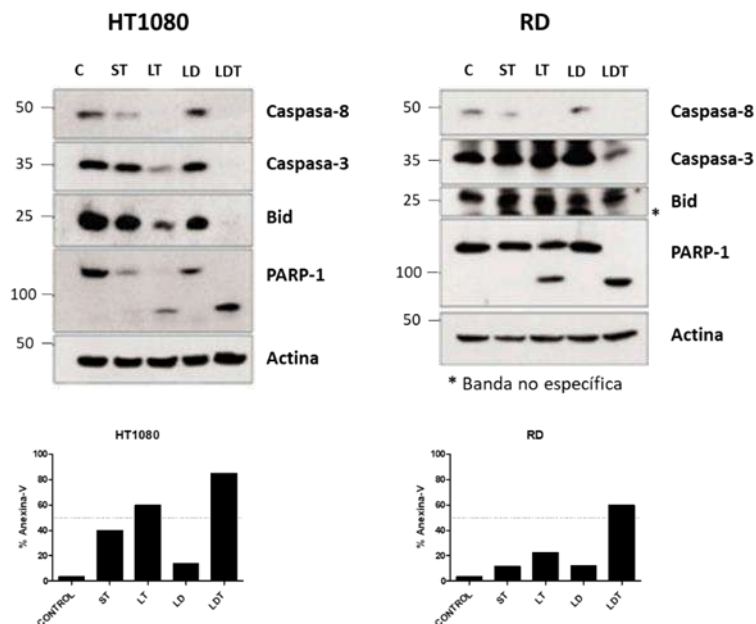


Figura 4.38 Análisis de la activación de caspasas en líneas celulares de sarcoma. Las líneas celulares HT1080 y RD fueron tratadas con TRAIL soluble (ST), LUV-TRAIL (LT), LUVDOX (LD) y LUVDOX-TRAIL (LDT) a una concentración de 1 µg/ml de TRAIL y/o 64,5 µM de doxorrubicina durante una incubación de 8 horas. Células no tratadas se utilizaron como control (C). Tras la incubación, se procedió al lisado celular y al análisis mediante *Western blot*. Los niveles de muerte celular se midieron por citometría de flujo.

Las células HT1080 tratadas con TRAIL soluble presentaron una moderada activación de la caspasa-8, que indujo un nivel de procesamiento de la pro-caspasa-3 suficiente para activar eficientemente PARP-1 y alcanzar una muerte celular del 40%. Esta muerte celular parece ser independiente de la amplificación a través de la ruta intrínseca, dada la ausencia de procesamiento de la proteína mitocondrial Bid. El tratamiento con LUVDOX sobre las células HT1080 respondió a un perfil de activación de la ruta similar a TRAIL soluble, pero induciendo inferiores niveles de activación proteica, que resultó en un porcentaje de muerte celular no superior al 20%. Por otro lado, la incubación con LUV-TRAIL indujo un claro procesamiento de la pro-caspasa-8, la cual a su vez fue capaz de activar las proteínas Bid y caspasa-3. El resultado fue una activación muy eficiente de PARP-1, que generó una muerte celular en torno al 60% de las células totales. Finalmente, la estimulación de las células HT1080 con LUVDOX-TRAIL indujo una completa activación de todas las proteínas de la cascada apoptótica, que se tradujo en una muerte celular que sobrepasa el 90%.

La línea celular RD respondió a los tratamientos de manera similar que las células HT1080, aunque con inferiores niveles de activación proteica y muerte celular. En este caso, TRAIL soluble y LUVDOX indujeron una ligera activación de la caspasa-8 que imposibilitó la correcta ejecución de la cascada apoptótica, adquiriendo niveles de muerte celular inferiores al 20%. Por el contrario, los tratamientos con LUV-TRAIL y LUVDOX-TRAIL procesaron eficientemente la pro-caspasa-8, siendo la activación de LUVDOX-TRAIL la única capaz de procesar completamente PARP-1 a través de la caspasa-3, induciendo un porcentaje de apoptosis del 60%.

Los resultados mostrados en la Figura 4.38 permiten confirmar que LUVDOX-TRAIL es capaz de incrementar la actividad citotóxica de TRAIL mediante una potente activación de la ruta extrínseca de la apoptosis, en comparación con TRAIL soluble y LUV-TRAIL, en líneas celulares de sarcoma. Asimismo, el efecto potenciador de la cascada apoptótica parece venir determinado por la combinación de TRAIL y doxorrubicina en el liposoma, ya que el tratamiento con doxorrubicina encapsulada no ejerció una eficiente activación

de la ruta apoptótica en sí mismo. Estos datos concuerdan con los previamente obtenidos de anteriores experimentos realizados por nuestro grupo, en una amplia variedad de líneas tumorales [403]. También destacó la intensa activación de la ruta mitocondrial observada en el tratamiento de las células HT1080 con LUVDOX-TRAIL.

A la vista de los resultados obtenidos con la nueva formulación de LUVDOX-TRAIL, se quiso estudiar el mecanismo subyacente a la muerte inducida por LUV-TRAIL con doxorubicina encapsulada en su interior. Con este objetivo, se diseñaron una serie de experimentos donde se combinaron los diferentes tratamientos con varios inhibidores que incluyen el anticuerpo monoclonal bloqueante de TRAIL, RIK2, los inhibidores de caspasas, z-VAD-fmk e IETD-fmk y el inhibidor de dinamina, dynasore. En el ensayo, además de analizar el efecto de LUV-TRAIL, LUVDOX, LUVDOX-TRAIL y doxorubicina soluble, se incluyó el estudio de la combinación de LUV-TRAIL y doxorubicina soluble, así como de LUV-TRAIL y LUVDOX, con el objetivo de determinar si la combinación de los componentes doxorubicina y TRAIL en la misma formulación liposomal (LUVDOX-TRAIL) tiene el mismo efecto que la administración en formulaciones independientes (LUV-TRAIL + doxorubicina soluble o LUVDOX + LUV-TRAIL). Los resultados se muestran en la Figura 4.39.

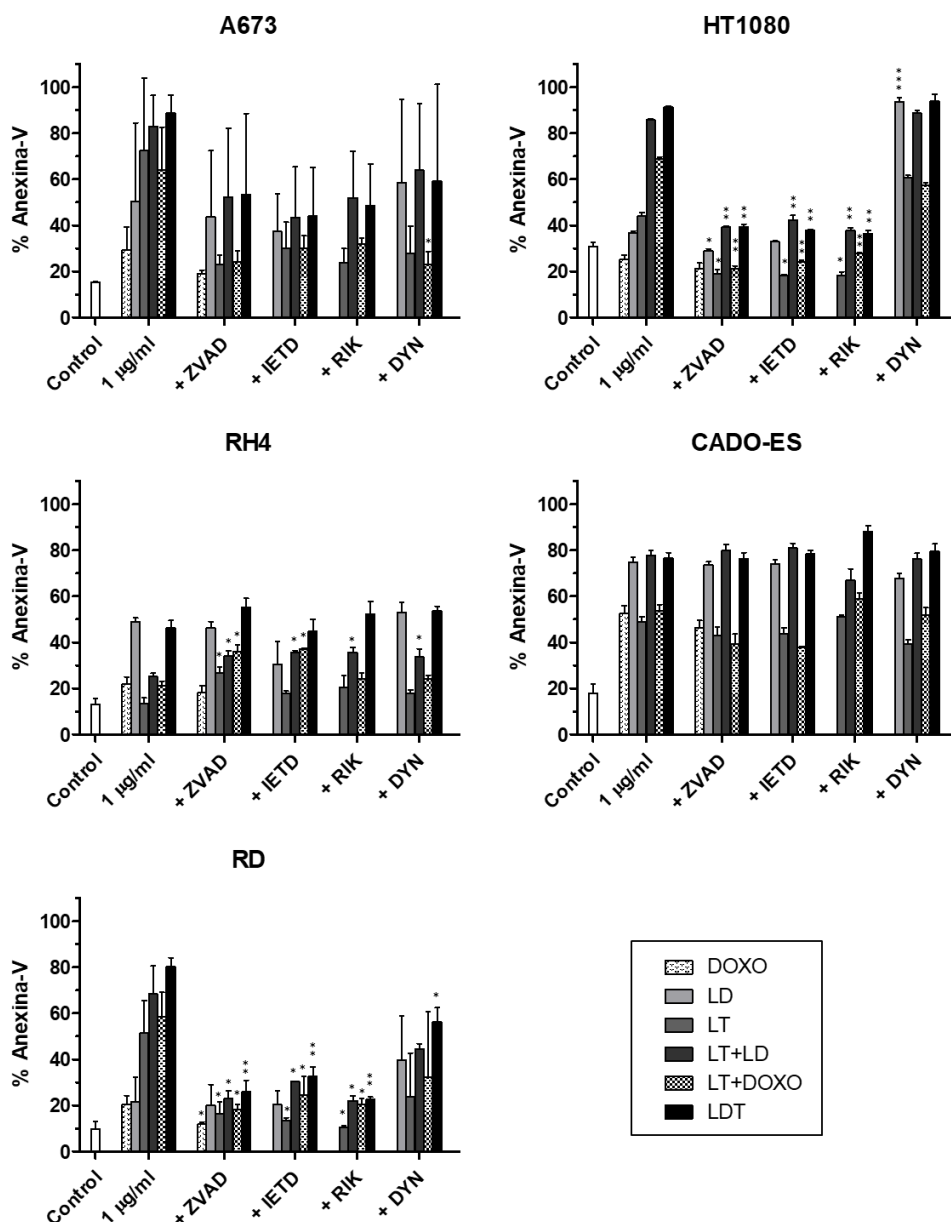


Figura 4.39 Caracterización de la muerte celular inducida por LUVDOX y LUVDOX-TRAIL en líneas celulares de sarcoma. Las células A673, HT1080, RH4, CADO-ES y RD se pre-incubaron con los inhibidores z-VAD-fmk (30 µM), z-IETD-fmk (30 µM), RIK (500 ng/ml), y dynasore (80 µM) durante 1 hora. Posteriormente, las células se trataron con LUVDOX (LD), LUVDOX-TRAIL (LDT), LUV-TRAIL (LT) y doxorubicina (DOXO), así como sus diferentes combinaciones a una concentración de liposomas equivalente a 1 µg/ml de TRAIL y/o 64,5 µM de doxorubicina. A las 6 horas de tratamiento, se analizó la muerte celular mediante marcaje con anexina-V. Las gráficas muestran la media±SD de al menos tres experimentos independientes. Los asteriscos reflejan la significación de cada tratamiento con los diferentes inhibidores con respecto al tratamiento sin inhibidor (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, ±95%CI).

Las células A673 presentaron una elevada citotoxicidad cuando se trataron con LUVDOX-TRAIL, así como la combinación de LUVDOX y LUV-TRAIL. En ambos casos, el tratamiento tras la pre-incubación con los inhibidores z-VAD-fmk, z-IETD-fmk y RIK redujo el porcentaje de muerte celular, alcanzando valores de aproximadamente el 50% de apoptosis. Este efecto de bloqueo parcial de la muerte celular en el tratamiento con LUVDOX-TRAIL y la combinación de LUVDOX y LUV-TRAIL, también se observó al interferir en el proceso de endocitosis dependiente de dinamina, mediante la incubación con dynasore, donde se detectó una disminución en la muerte celular que alcanzó el 60% de células apoptóticas. Del mismo modo, la apoptosis inducida por LUV-TRAIL y la combinación de LUV-TRAIL y doxorubicina también se vio bloqueada por los inhibidores z-VAD-fmk, z-IETD-fmk, RIK y dynasore, llegando incluso a alcanzar los niveles basales de muerte celular. Por el contrario, no se observaron cambios significativos en el empleo de las moléculas bloqueantes de caspasas, TRAIL o endocitosis para los tratamientos con LUVDOX o doxorubicina soluble.

La línea celular HT1080 no presentó sensibilidad al efecto de la doxorubicina, ya sea administrada de forma soluble o encapsulada en la formulación LUVDOX. La muerte celular inducida por LUV-TRAIL en las células HT1080 alcanzó un 50%, sin embargo, la combinación de LUV-TRAIL con doxorubicina soluble indujo un incremento de muerte celular hasta el 70% de células apoptóticas. Por otro lado, los tratamientos LUVDOX-TRAIL y la combinación LUV-TRAIL y LUVDOX tuvieron un efecto citotóxico similar sobre las células HT1080, alcanzando valores del 90% de muerte celular. Respecto al análisis de los mecanismos celulares de inducción de apoptosis mediante el empleo de inhibidores, se pudo observar cómo la utilización de bloqueantes de caspasas, z-VAD-fmk y z-IETD-fmk, así como el anticuerpo bloqueante de TRAIL, RIK, inhibieron la muerte celular de forma equivalente. La disminución del porcentaje de muerte celular tras la pre-incubación con z-VAD-fmk, z-IETD-fmk y RIK registró valores significativos para el tratamiento con LUV-TRAIL, alcanzando mayores diferencias significativas para los tratamientos con LUVDOX-TRAIL y las combinaciones de LUV-TRAIL con LUVDOX y con doxorubicina soluble, tras la pre-incubación con dichos inhibidores. Por el contrario, el inhibidor dynasore

ejerció un efecto potenciador de la muerte celular inducida por la formulación LUVDOX.

Las células RH4 presentaron resistencia a la muerte inducida por LUV-TRAIL, así como una ligera sensibilidad al efecto citotóxico de la doxorubicina soluble que indujo apoptosis en torno al 20% de las células. Valores equivalentes de muerte celular se produjeron con los tratamientos combinados de doxorubicina (en forma soluble y LUVDOX) con LUV-TRAIL. Por otro lado, las células RH4 fueron sensibles a la muerte inducida por LUVDOX y LUVDOX-TRAIL, alcanzando en ambos casos en torno a un 50% de muerte celular. Los resultados indican que la citotoxicidad equivalente de los tratamientos LUVDOX y LUVDOX-TRAIL viene determinada por el efecto de la encapsulación de doxorubicina dentro de las nanopartículas lipídicas y no al efecto citotóxico de TRAIL, ya que las células presentaron resistencia a la muerte celular inducida por TRAIL en cualquiera de las formulaciones administradas. El bloqueo de las caspasas de la ruta apoptótica, mediante la pre-incubación con z-VAD-fmk, incrementó de forma significativa el porcentaje de muerte celular cuando las células RH4 se trataron con LUV-TRAIL, así como su combinación con doxorubicina soluble y LUVDOX. Este incremento podría deberse a la inducción de muerte mediante un mecanismo de necroptosis ante el estímulo del ligando mortal en el contexto de un bloqueo de la ruta apoptótica en unas células como las RH4, deficitarias en la caspasa-8. La pre-incubación con el inhibidor específico de la caspasa-8, z-IETD-fmk, tuvo un efecto similar al observado con el bloqueante z-VAD-fmk. Por otro lado, la pre-incubación de las células RH4 con el anticuerpo bloqueante de TRAIL, RIK, así como con el inhibidor dynasore, generó un incremento significativo en la muerte celular inducida por el tratamiento combinatorio de LUV-TRAIL y LUV-DOX, sin afectar al resto de tratamientos.

La línea celular CADO-ES, a diferencia de las células RH4, fueron sensibles al efecto citotóxico de doxorubicina soluble. Las células presentaron un porcentaje del 50% de muerte celular para los tratamientos con doxorubicina soluble, LUV-TRAIL, así como la combinación de ambos compuestos. La muerte celular ejercida por LUV-TRAIL, que se observó en el experimento, se debía al

efecto ejercido por las nanopartículas lipídicas por sí mismas, ya que las células CADO-ES son resistentes a la muerte inducida por el ligando mortal TRAIL, hecho comprobado en experimentos anteriores. Por otro lado, los tratamientos LUVDOX, LUVDOX-TRAIL y la combinación de LUV-TRAIL y LUVDOX presentaron un fuerte efecto citotóxico sobre las células CADO-ES, mostrando valores de muerte celular próximos al 80%. Estos resultados permiten comprobar de nuevo la elevada sensibilidad de las células CADO-ES al efecto intrínseco de las nanopartículas lipídicas, característica que permite potenciar el efecto citotóxico de la doxorubicina mediante la vectorización en los liposomas. Por otro lado, el empleo de los inhibidores z-VAD-fmk, z-IETD-fmk, RIK y dynasore no produjo cambios significativos en los valores de muerte celular de los tratamientos analizados. Este hecho podría indicar que la muerte celular ejercida por los liposomas y la doxorubicina (administrada en las diferentes formulaciones) en las células CADO-ES no está mediada por la activación de las caspasas en la cascada apoptótica.

Las células RD presentaron una baja sensibilidad al efecto citotóxico de doxorubicina, tanto en su forma soluble como encapsulada en la formulación LUVDOX. El tratamiento con LUV-TRAIL indujo una muerte celular de aproximadamente el 50%, porcentaje que se incrementó hasta un 60% cuando LUV-TRAIL se administró junto con doxorubicina soluble, alcanzando valores del 70% de muerte celular cuando se combinaron con LUVDOX. La formulación LUVDOX-TRAIL fue el tratamiento citotóxico analizado más eficiente en la línea celular RD, produciendo una apoptosis superior al 80%. Así mismo, la utilización de los inhibidores de caspasas, z-VAD-fmk y z-IETD-fmk, así como el anticuerpo bloqueante de TRAIL, RIK, redujeron la muerte celular de forma significativa en los tratamientos de las células RD con LUV-TRAIL y la combinación de LUV-TRAIL con doxorubicina en las diferentes formas de administración (LUVDOX y doxorubicina soluble). La disminución en los niveles de muerte celular tras la pre-incubación con los inhibidores z-VAD-fmk, z-IETD-fmk y RIK, aún adquirió mayores niveles de significación para el tratamiento de las células con LUVDOX-TRAIL. Por otro lado, el inhibidor dynasore bloqueó parcialmente la muerte celular inducida por los tratamientos con LUV-TRAIL y sus correspondientes

combinaciones sin alcanzar diferencias significativas con respecto al efecto del tratamiento sin el inhibidor, a excepción de la formulación LUVDOX-TRAIL, donde el bloqueo del proceso de endocitosis afectó a la muerte celular adquiriendo valores del 60% de células apoptóticas. Los resultados de citotoxicidad obtenidos del análisis con los inhibidores determinan que la apoptosis inducida por la doxorubicina encapsulada en los liposomas, la inducción de muerte celular por el ligando mortal TRAIL anclado a la superficie de los liposomas, así como las diferentes combinaciones de tratamientos, eran dependientes de la actividad de las caspasas, siendo el ligando mortal TRAIL determinante para la ejecución óptima de la vía extrínseca mostrando además que la endocitosis dependiente de dinamina no jugaba un papel relevante.

Los resultados obtenidos hasta el momento, indican que LUVDOX-TRAIL presenta una mayor actividad anti-tumoral frente a los LUV-TRAIL clásicos, donde la potente activación de la vía extrínseca de la apoptosis a través de las caspasas es determinante. Además, la activación de las caspasas parece producirse de forma rápida y simultánea. Con el objetivo de comprobar esta hipótesis, se diseñó un experimento para analizar la activación de la ruta apoptótica tras la inhibición de las caspasas mediante la pre-incubación con z-VAD-fmk, al tiempo de 6 horas de tratamiento con LUV-TRAIL, LUVDOX y LUVDOX-TRAIL en las células HT1080 y RD. Los resultados obtenidos mediante *Western blot* se muestran en la Figura 4.40.

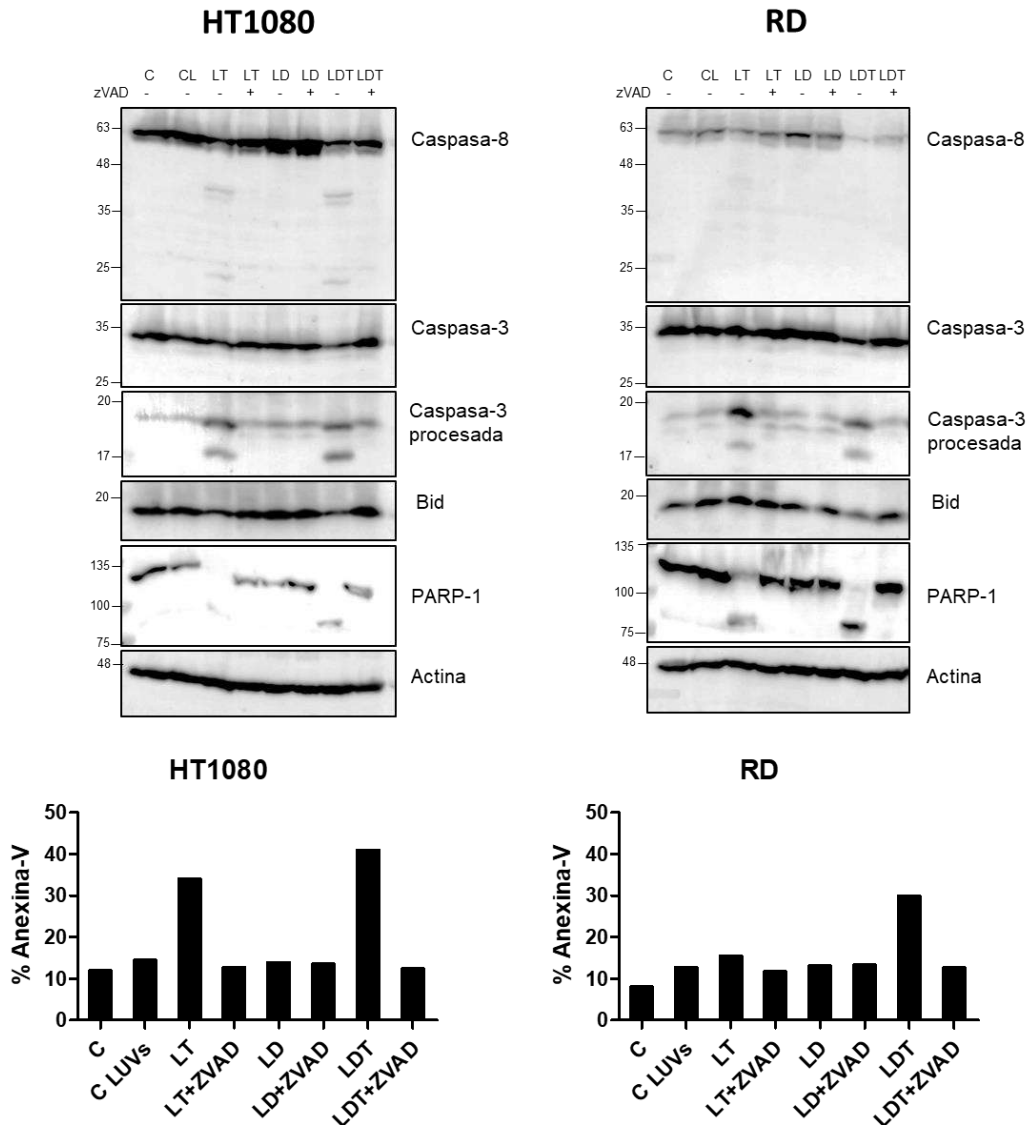


Figura 4.40 Análisis de la activación de caspasas en líneas celulares de sarcoma tras el tratamiento con LUV-TRAIL, LUVDOX y LUVDOX-TRAIL. Las células HT1080 y RD se trataron con LUV-TRAIL (LT), LUVDOX (LD) y LUVDOX-TRAIL (LDT) a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ de TRAIL y/o 64,5 μM de doxorubicina durante 6 horas. Previamente, las células se incubaron con el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk (30 μM). Células sin tratar (C) y células tratadas con liposomas desnudos (CL) se incluyeron como control. Finalizado el tiempo de incubación, se procedió al lisado celular y al análisis mediante *Western blot*. Los niveles de muerte celular se midieron por citometría de flujo.

Las células HT1080 y RD presentaron un procesamiento de las caspasas-8 y -3 tras tratamiento con LUV-TRAIL y LUVDOX-TRAIL. Esta activación se

tradujo en el procesamiento de sus respectivos sustratos específicos, Bid y PARP-1 durante la ejecución de la muerte celular apoptótica, tal y como se observó en el análisis de la muerte celular que se realizó en paralelo (Figura 4.40 paneles inferiores). Así mismo, la pre-incubación con el inhibidor general de caspasas, z-VAD-fmk, bloqueó por completo la activación de las caspasas-8 y -3, inhibiendo la muerte celular. Por otro lado, no se observó procesamiento de las proteínas analizadas de la ruta extrínseca de la apoptosis tras el tratamiento con LUVDOX en las células HT1080 y RD. Los resultados obtenidos indican que la inducción de muerte celular ejercida por la formulación LUVDOX-TRAIL está directamente mediada por la activación de las caspasas pertenecientes a la ruta extrínseca de la apoptosis.

Los resultados positivos obtenidos en los estudios de capacidad citotóxica de la formulación LUVDOX-TRAIL sobre un extenso panel de líneas tumorales [403], hizo que nuestro grupo continuara con el estudio de la formulación LUVDOX-TRAIL con vista a su posible uso como agente anti-tumoral. Para ello, tras analizar su mecanismo de acción, se quiso comprobar en primer lugar la toxicidad de la formulación en células primarias normales. Para ello, se llevaron a cabo ensayos por integrantes de nuestro grupo, en los que se trataron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células T activadas con LUVDOX y LUVDOX-TRAIL. Los resultados iniciales obtenidos evidenciaron un elevado grado de toxicidad producido por la elevada concentración de doxorrubicina encapsulada en los liposomas (64,5 μM) [403]. Este hallazgo obligó a reformular la molécula LUVDOX-TRAIL, manteniendo la misma concentración de TRAIL anclada a la superficie de los liposomas pero disminuyendo 10 veces la concentración empleada en la encapsulación, estableciéndose en una concentración final de 6,45 μM de doxorrubicina.

La disminución de la concentración de doxorrubicina redujo drásticamente la toxicidad sobre células normales como PBMC y células T activadas [403]. Sin embargo, la nueva formulación generada tras el cambio en la concentración de doxorrubicina, denominada LUVDOX-TRAIL (1/10), podía no sólo haber visto reducida su capacidad citotóxica en células normales, sino también en células

tumorales. Por ello, fue necesario analizar la capacidad de inducción de apoptosis de la nueva formulación con una concentración inferior de doxorrubicina sobre las líneas celulares tumorales provenientes de distintos tipos de sarcoma. Con este objetivo se reprodujeron los experimentos de la Figura 4.37 empleando LUVDOX (1/10) y LUVDOX-TRAIL (1/10). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.41.

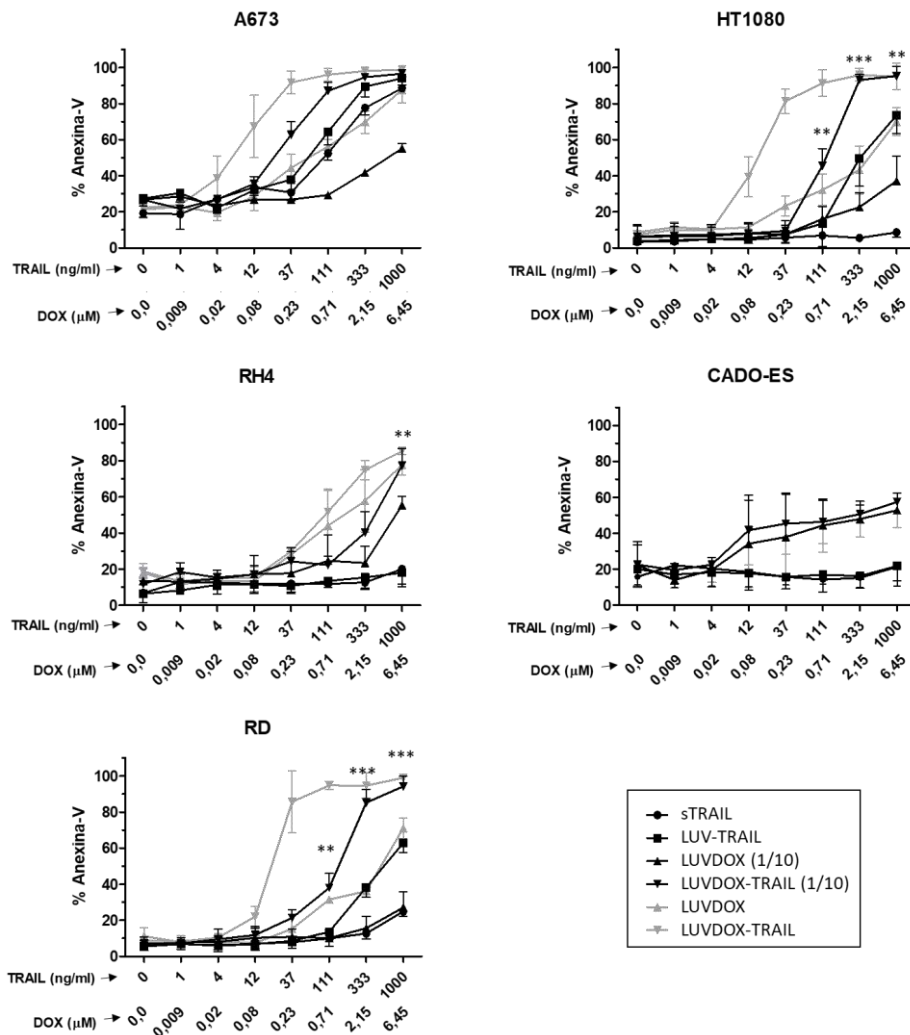


Figura 4.41 Citotoxicidad de LUVDOX-TRAIL (1/10) en líneas celulares de sarcoma. Las células A673, HT1080, RH4, CADO-ES y RD fueron tratadas con TRAIL soluble, LUV-TRAIL, LUVDOX (1/10) y LUVDOX-TRAIL (1/10) a diferentes concentraciones de TRAIL (0-1000 ng/ml) y/o doxorrubicina (0-6,45 μ M) en su formulación. Tras 24 horas de incubación, se analizó la muerte celular mediante marcaje con anexina-V, por citometría de flujo. Las gráficas muestran la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Los asteriscos reflejan la significación con respecto a LUV-TRAIL (** $p<0,01$, *** $p<0,001$, $\pm 95\%$ CI).

Tomando como referencia la citotoxicidad de los liposomas con la concentración de doxorrubicina más elevada (Figura 4.37), se observó como la capacidad de inducción de apoptosis de LUVDOX-TRAIL tras disminuir la concentración de doxorrubicina no varió a dosis altas, pero sí se redujo a dosis intermedias. Este hecho ocurre principalmente en la línea celular A673 altamente sensible a la apoptosis inducida por TRAIL, y también en las líneas celulares parcialmente sensibles a TRAIL, HT1080 y RD. También se produjo una disminución considerable en la citotoxicidad de LUVDOX (1/10) a lo largo de todo el rango de concentraciones empleadas a excepción de las concentraciones más elevadas. En el caso de las células resistentes a TRAIL, RH4 también presentó una ligera disminución en la citotoxicidad de LUVDOX (1/10) y LUVDOX-TRAIL (1/10) a concentraciones intermedias, en comparación con los liposomas con doxorrubicina concentrada. Sin embargo, la capacidad apoptótica de LUVDOX (1/10) y LUVDOX-TRAIL (1/10) en las células CADO-ES se vio reducida a la mitad a lo largo de toda la curva de concentraciones estudiadas.

Los resultados obtenidos en la Figura 4.41 permiten concluir que la reducción en la concentración de la doxorrubicina encapsulada no afecta negativamente al potencial citotóxico de LUVDOX-TRAIL en células de sarcoma altamente y parcialmente sensibles a TRAIL a la concentración máxima de TRAIL analizada. Resultados similares se han obtenido en otros estudios realizados por nuestro grupo en otras líneas celulares tumorales humanas de distinto origen [403].

En vista de los prometedores resultados obtenidos del estudio de LUVDOX-TRAIL como agente anti-tumoral, cobra interés no sólo analizar su potencial citotóxico sino también su cinética de acción. Para ello, se realizaron experimentos a diferentes tiempos sobre las líneas celulares de sarcoma sensibles a TRAIL, que incluyó un estudio comparativo entre las diferentes formulaciones liposomales generadas a varias concentraciones de TRAIL. Las células A673, debido a su elevada sensibilidad a la apoptosis inducida por el ligando mortal y a la ausencia de diferencias significativas observadas entre los efectos de LUV-TRAIL y LUVDOX-TRAIL (1/10), fueron analizadas con una única

dosis de liposomas, correspondiente a 1 µg/ml de TRAIL/ 6,45 µM de doxorrubicina. Las gráficas de la Figura 4.42 muestran los resultados obtenidos.

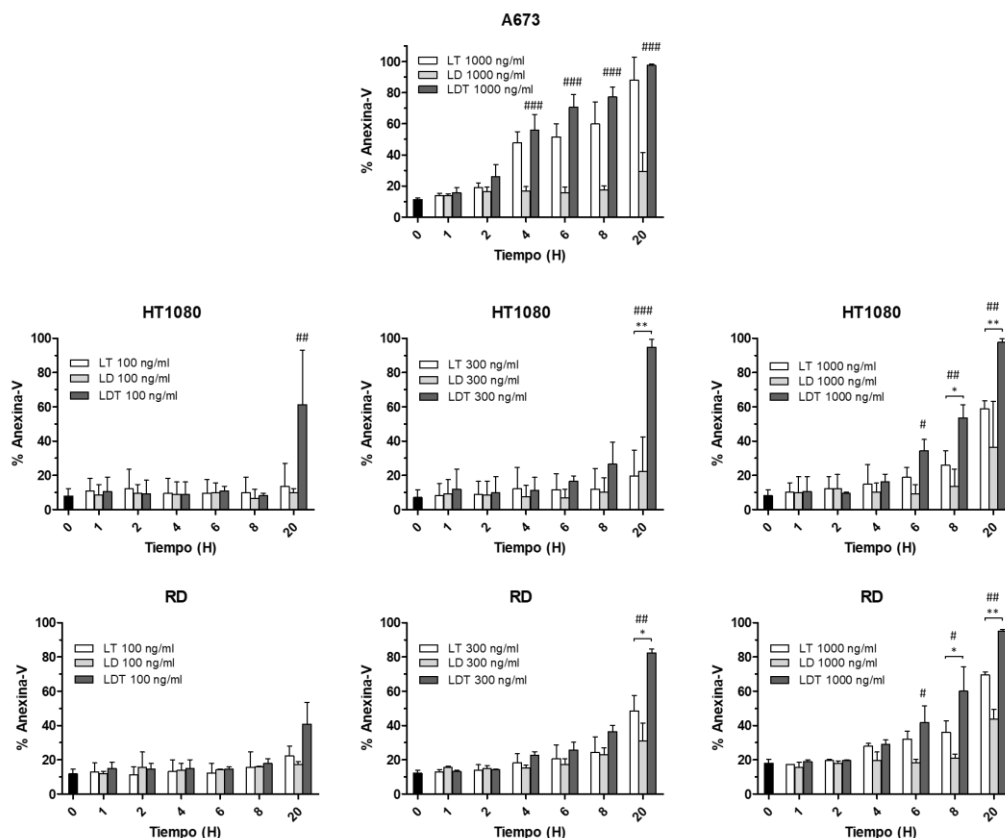


Figura 4.42 Análisis comparativo de la citotoxicidad de LUV-TRAIL, LUVDOX (1/10) y LUVDOX-TRAIL (1/10) a diferentes tiempos sobre células A673, HT1080 y RD. Las células de sarcoma A673, HT1080 y RD se trataron con LUV-TRAIL, LUVDOX (1/10) y LUVDOX-TRAIL (1/10), denominados con las siglas LT, LD y LDT respectivamente. Las concentraciones de liposomas empleados corresponden a 100, 300 y 1000 ng/ml de TRAIL (0, 7, 2 y 6,45 µM de doxorrubicina aproximadamente). Tras un periodo de incubación de 1, 2, 4, 6, 8 y 20 horas, se midieron los niveles de muerte celular mediante un marcaje con anexina-V. Las gráficas muestran la media±SD de al menos tres experimentos independientes. El signo asterisco indica la significación entre LT y LDT (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, ±95%CI). El signo almohadilla indica la significación entre LD y LDT (# $p<0,05$, ## $p<0,01$, ### $p<0,001$, ±95%CI).

Las células A673 presentaron una respuesta equivalente y gradual a lo largo del tiempo frente a la citotoxicidad producida por LUV-TRAIL y LUVDOX-TRAIL (1/10), siendo ligeramente mayor el potencial apoptótico de LUVDOX-TRAIL (1/10). Por otro lado, LUVDOX (1/10) sólo fue capaz de inducir muerte

celular a los tiempos más largos de incubación, sin superar el 30% de células apoptóticas.

En el caso de la línea celular HT1080, las concentraciones bajas de las formulaciones liposomales analizadas (correspondientes a 100 y 300 ng/ml de TRAIL) no indujeron una elevada muerte celular, a excepción de la incubación al tiempo más largo de 20 horas en el tratamiento con LUVDOX-TRAIL (1/10), alcanzando un porcentaje prácticamente del 100% de muerte celular a la concentración de 300 ng/ml del ligando mortal. Por otro lado, cuando las células HT1080 se incubaron a la dosis máxima de tratamiento, se observó un incremento de muerte celular conforme aumentó el tiempo de exposición con las tres formulaciones analizadas. En este caso, LUVDOX-TRAIL (1/10) presentó de forma significativa un mayor potencial apoptótico con respecto a LUV-TRAIL a los tiempos de 8 y 20 horas.

De forma similar a las células HT1080, la línea celular RD presentó sensibilidad a la dosis mínima analizada únicamente en el tratamiento con LUVDOX-TRAIL (1/10) al tiempo máximo de 20 horas, aunque sin superar valores del 40% de muerte celular. Por otro lado, a la concentración intermedia analizada de 300 ng/ml, se observó un aumento en la citotoxicidad en relación con el tiempo de incubación con los tres tratamientos, alcanzando de nuevo diferencias significativas entre LUVDOX-TRAIL (1/10) y LUV-TRAIL en el periodo de 20 horas. Este aumento en el potencial citotóxico en relación con el periodo de incubación también se reflejó en la concentración máxima de TRAIL acoplado a los liposomas, llegando a una muerte celular inducida por LUVDOX-TRAIL (1/10) del 60% a las 8 horas y alcanzando el 100% al tiempo máximo de incubación de 20 horas.

Los resultados obtenidos en los ensayos comparativos de los tratamientos LUV-TRAIL, LUV-DOX (1/10) y LUVDOX-TRAIL (1/10) a diferentes tiempos de incubación (Figura 4.42) permiten concluir que la combinación de doxorrubicina y TRAIL en la misma nanopartícula lipídica produce una sinergia que mejora la capacidad citotóxica del ligando mortal, así como una cinética de acción más

rápida de LUVDOX-TRAIL, alcanzando valores de muerte celular en torno al 100% a las concentraciones de TRAIL más altas con respecto al tratamiento con LUV-TRAIL en las líneas celulares de sarcoma analizadas.

4.6 Estudio de la actividad anti-tumoral *ex vivo* de LUVDOX-TRAIL en células tumorales primarias

Tras los buenos resultados de citotoxicidad obtenidos con la formulación LUVDOX-TRAIL en las líneas celulares de sarcoma analizadas, se analizó el efecto anti-tumoral de las diferentes formulaciones de TRAIL sobre células tumorales aisladas de tumores de pacientes con sarcoma. Para ello, se obtuvieron muestras frescas de biopsias de 3 pacientes con sarcoma, cuyas células se aislaron siguiendo el protocolo indicado en Materiales y Métodos (Apartado 3.2.5.3).

Inicialmente, se analizó la expresión de los 2 receptores mortales pro-apoptóticos de TRAIL, DR4 y DR5, en la superficie de las células tumorales primarias mediante citometría de flujo empleando anticuerpos específicos. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 4.43.

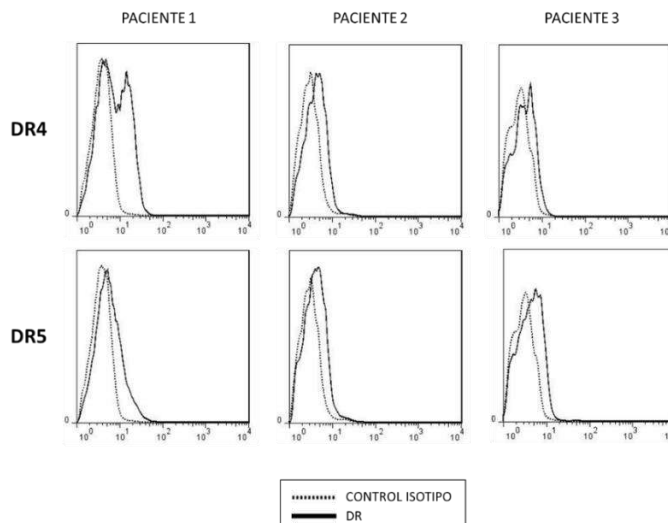


Figura 4.43 Análisis de la expresión de los receptores de TRAIL en la superficie de células derivadas de paciente con sarcoma. Los niveles de expresión de DR4 y DR5 se analizaron con un marcaje con anticuerpos específicos marcados con fluorocromos contra cada receptor mortal. Los valores de fluorescencia se midieron mediante citometría de flujo y se representaron junto con el control de isotipo correspondiente.

El análisis de los receptores, mostrado en la Figura 4.43, indica que las células tumorales de sarcoma procedentes de los 3 pacientes expresaban, en mayor o menor medida, los 2 receptores mortales pro-apoptóticos DR4 y DR5 en superficie.

Atendiendo a la expresión del receptor DR4 en superficie, el paciente 1 presentó dos poblaciones celulares, un grupo celular que expresó altos niveles de DR4 y otro grupo que careció de su presencia en la membrana plasmática. Por el contrario, la expresión del receptor DR5 en el paciente 1 fue positiva aunque significativamente menor que la del receptor DR4. El paciente 2 presentó expresión de DR4 y DR5 de forma equivalente en la superficie celular, mientras que en el paciente 3, la expresión de DR5 fue mayor que la del receptor DR4.

La presencia de los receptores mortales de TRAIL en superficie hace posible que las distintas formulaciones de TRAIL puedan ejercer un efecto citotóxico sobre las células de sarcoma derivadas de estos pacientes. Por ello, se realizó un ensayo citotóxico para validar el posible efecto anti-tumoral de distintas formulaciones de TRAIL. Las células se incubaron con TRAIL soluble, LUV-TRAIL, LUVDOX 1/10, LUVDOX-TRAIL 1/10, así como doxorubicina soluble durante 16 horas a una concentración de TRAIL de 2 µg/ml. Como control de muerte celular específica de TRAIL se incluyó el empleo del anticuerpo bloqueante de TRAIL, RIK, y el inhibidor general de caspasas, z-VAD-fmk en el tratamiento con LUV-TRAIL sobre uno de los pacientes. La representación del porcentaje de muerte celular se realizó teniendo en cuenta los valores específicos de muerte celular derivados del tratamiento, que se obtuvieron tras restar la muerte celular basal a la muerte celular total obtenida en cada punto experimental. Los datos obtenidos se representan en la Figura 4.44.

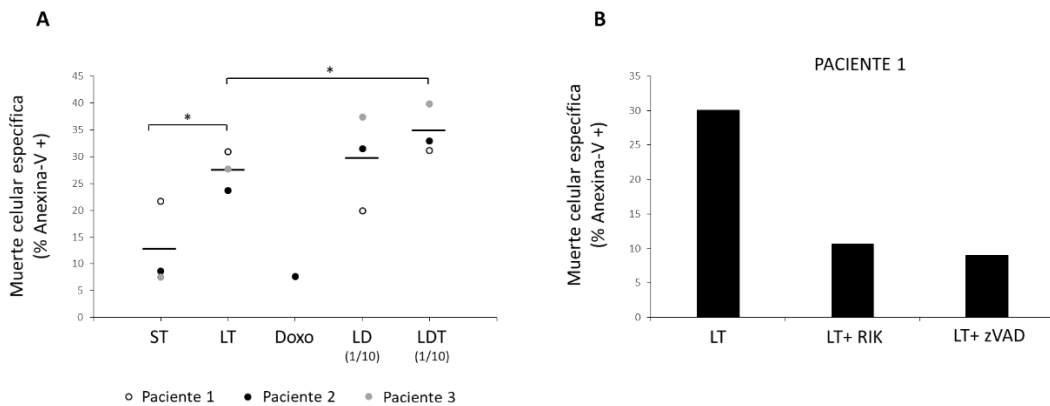


Figura 4.44 Citotoxicidad de diferentes formulaciones de TRAIL en células humanas de sarcoma procedentes de paciente. A. Las células obtenidas de los pacientes 1, 2 y 3 fueron tratadas con TRAIL soluble (ST), LUV-TRAIL (LT), doxorubicina soluble (Doxo), LUVDOX 1/10 (LD (1/10)) y LUVDOX-TRAIL 1/10 (LDT (1/10)) a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ de TRAIL y/o 6,45 μM de doxorubicina, durante 16 horas. **B.** Las células tumorales obtenidas del paciente 1 se pre-incubaron una hora con RIK (500 ng/ml) y z-VAD-fmk (30 μM). Tras el periodo de incubación con los inhibidores, las células se trataron con LUV-TRAIL a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ durante 16 horas. Una vez finalizado el tiempo de incubación de los experimentos, las células se marcaron con anexina-V y los resultados se analizaron mediante citometría de flujo. (* $p < 0,05$, $\pm 95\% \text{CI}$).

Los datos de citotoxicidad muestran como las células de sarcoma procedentes de los pacientes analizados fueron sensibles al efecto anti-tumoral inducido por TRAIL. Las células fueron ligeramente sensibles a la apoptosis inducida por TRAIL soluble, cuya media de muerte celular específica no superó el 15% de la muerte celular específica. Sin embargo, la citotoxicidad inducida por LUV-TRAIL aumentó con respecto a la forma soluble del ligando, alcanzando una diferencia significativa con respecto a TRAIL soluble. La incubación de las células con doxorubicina soluble a la concentración presente en los liposomas encapsulados con la misma no presentó citotoxicidad, sin embargo, el tratamiento con LUVDOX 1/10 indujo elevados niveles de muerte celular. No obstante, LUVDOX-TRAIL 1/10 fue la formulación que presentó mayor potencial citotóxico, alcanzando también una diferencia significativa con respecto a LUV-TRAIL, significación no presente en el tratamiento con LUVDOX 1/10.

Asimismo, la incubación con el bloqueante de TRAIL, RIK, previamente al tratamiento con LUV-TRAIL en el paciente 1, redujo a más de la mitad el valor obtenido de muerte celular, lo que indica que la ejecución de apoptosis es

principalmente mediada por TRAIL. De forma similar se bloqueó la muerte celular con la inhibición de las caspasas mediante el compuesto z-VAD-fmk, evidenciando que TRAIL induce una muerte celular orquestada por la activación de las caspasas en la cascada apoptótica.

La citotoxicidad observada en los experimentos realizados sobre células tumorales primarias provenientes de tumores de pacientes con sarcoma evidencia una sensibilidad al efecto anti-tumoral de TRAIL por parte de algunos tumores primarios de sarcoma con expresión positiva de los receptores mortales en superficie. En este sentido, el tratamiento con LUV-TRAIL es más eficiente que la forma soluble del ligando mortal, siendo además su potencial citotóxico incrementado con la encapsulación de doxorrubicina en el interior del liposoma, en la formulación LUVDOX-TRAIL 1/10.

4.7 Estudio de la actividad anti-tumoral *in vivo* de LUVDOX-TRAIL en un modelo tumoral animal

4.7.1 Estudio de la toxicidad *in vivo* de LUVDOX-TRAIL

Los positivos resultados obtenidos *in vitro* y *ex vivo* en relación a la capacidad citotóxica de LUVDOX-TRAIL hizo que se quisiera validar su eficacia anti-tumoral *in vivo*. De este modo se diseñó un modelo animal de xeno-injerto tumoral subcutáneo empleando las células HT1080 en ratones Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu}. La metodología utilizada se detalla en el apartado correspondiente a Materiales y Métodos (Apartado 3.2.8.1).

Dada la elevada citotoxicidad mostrada por la formulación LUVDOX-TRAIL *in vitro*, inicialmente se realizó un estudio de toxicidad tras su administración sistémica en ratones para corroborar la seguridad del tratamiento. De este modo, 5 animales fueron tratados con 36 µg de TRAIL administrados en la formulación LUVDOX-TRAIL 1/10 en 4 inyecciones con un intervalo de 2 días entre cada administración. Como control, 2 animales fueron tratados con PBS de forma paralela. Los animales fueron sacrificados a las dos semanas tras la última administración y los diferentes tejidos y la sangre se extrajeron de todos los

animales para su posterior análisis. Las imágenes histológicas obtenidas de los tejidos extraídos tras la tinción con hematoxilina-eosina se muestran en la Figura 4.45.

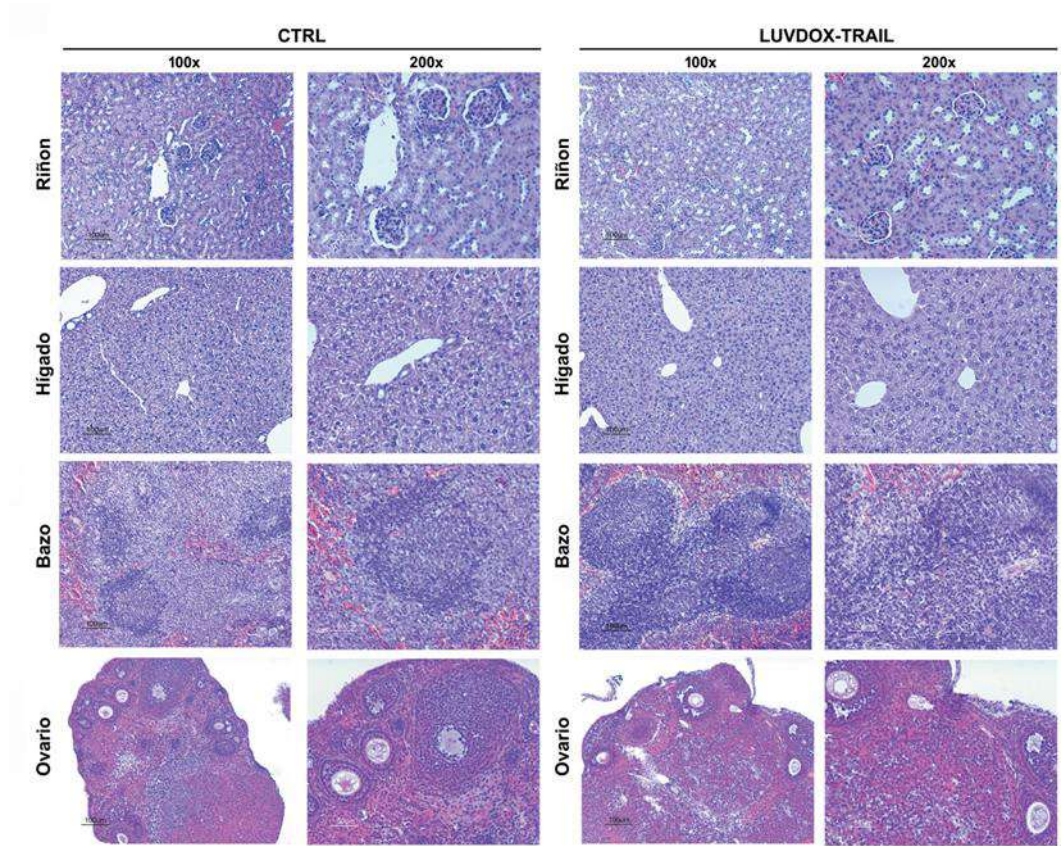


Figura 4.45 Estudio de la toxicidad *in vivo* en órganos de LUVDOX-TRAIL 1/10. A. Análisis histológico de los tejidos del riñón, hígado, bazo y ovario tras la administración en 4 dosis de PBS (CTRL) o LUVDOX-TRAIL con cantidades de 36 μg de TRAIL en días alternos. La tinción empleada fue hematoxilina-eosina.

Tal y como se observa en la Figura 4.45, en ninguno de los tejidos estudiados se evidenciaron signos de infiltrado inflamatorio, fibrosis o necrosis derivados del tratamiento con LUVDOX-TRAIL 1/10, descartando de este modo una toxicidad manifiesta en dichos órganos.

Además, dado el efecto hepatotóxico ampliamente descrito para el tratamiento con determinadas formulaciones de TRAIL [281], se llevó a cabo el

análisis en suero de los niveles de las enzimas hepáticas aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT). Por otra parte, una de las principales toxicidades descritas para la doxorrubicina es la toxicidad cardíaca [404]. A pesar de que en su forma liposomal se ha descrito que la cardiotoxicidad de la doxorrubicina es menor [405], se analizó en suero los niveles de la enzima creatin-kinasa (CK) y su forma cardíaca (CK-MB). Los resultados se muestran en la Figura 4.46.

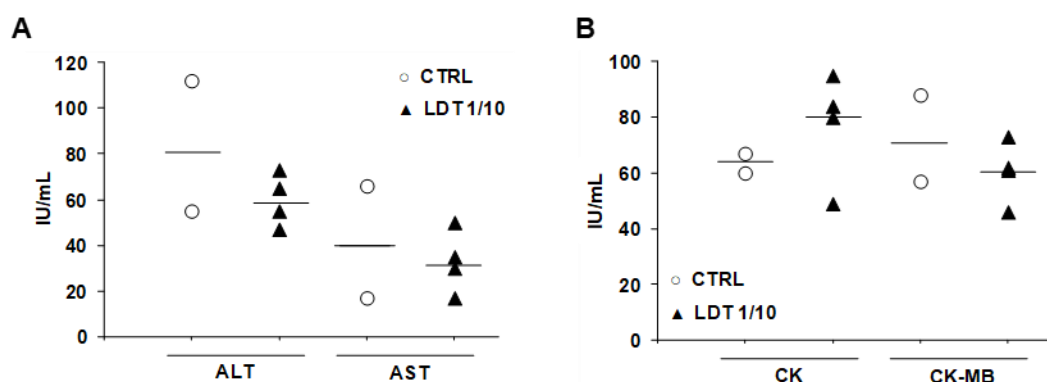


Figura 4.46 Estudio de la toxicidad hepática y cardíaca *in vivo* de LUVDOX-TRAIL 1/10. **A.** Determinación de los niveles en suero de las enzimas ALT y AST realizada por nefelometría. **B.** Determinación de los niveles en suero de las enzimas CK y CK-MB realizada mediante inmunoensayo automatizado. Para ambas determinaciones se empleó el suero obtenido mediante la centrifugación de las muestras de sangre obtenidas mediante punción cardíaca en los animales tratados. La representación muestra los valores obtenidos de 2 animales pertenecientes al grupo control (CTRL) y 4 animales del grupo LUVDOX-TRAIL 1/10 (LDT 1/10).

No se observaron aumentos en los niveles de las enzimas ALT y AST, lo que descartó un daño hepático en los animales, ni tampoco se produjo un aumento de los niveles de las enzimas CK y CK-MB indicando la ausencia de daño cardíaco.

De este modo, se pudo confirmar que el tratamiento con LUVDOX-TRAIL 1/10 es seguro como tratamiento anti-tumoral, no mostrando toxicidad sistémica ni efectos secundarios negativos visibles en los animales.

4.7.2 Estudio de la actividad anti-tumoral *in vivo* de LUVDOX-TRAIL

Una vez comprobada la seguridad en la administración sistémica de LUVDOX-TRAIL 1/10, se procedió a validar su eficacia como tratamiento anti-tumoral. Para ello, los animales se repartieron en 3 grupos: control, LUV-TRAIL y LUVDOX-TRAIL 1/10. Cuando el tumor injertado subcutáneo alcanzó el volumen de 100 mm³, se inició la administración intra-peritoneal de PBS, LUV-TRAIL o LUVDOX-TRAIL 1/10 con inyecciones durante 4 días consecutivos, con una cantidad de 36 µg de TRAIL por inyección. El crecimiento tumoral se monitorizó cada 1-2 días, considerándose criterio de punto final un volumen tumoral superior a 1000 mm³. La supervivencia de los ratones tratados con los distintos tratamientos se monitorizó durante 20 días. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 4.47.

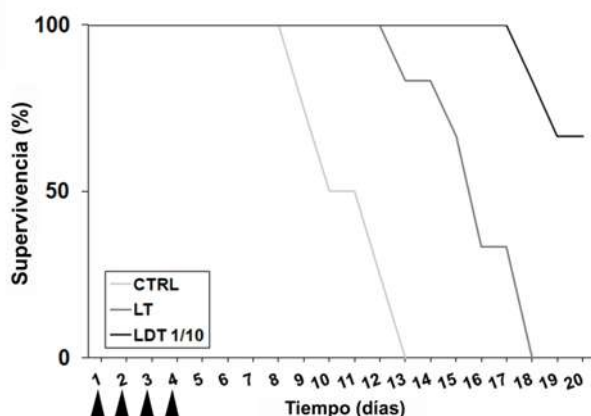


Figura 4.47 Supervivencia tras el tratamiento *in vivo* con LUVDOX-TRAIL 1/10. Los ratones con tumores xeno-gráficos fueron tratados durante 4 días con inyecciones intra-peritoneales de PBS (CTRL), LUV-TRAIL (LT, 36 µg de TRAIL/dosis) y LUVDOX-TRAIL 1/10 (LDT 1/10, 36 µg de TRAIL/dosis). El experimento se monitorizó durante 20 días. Representación del porcentaje de supervivencia mediante un gráfico Kaplan-Meier.

Como se puede observar en la Figura 4.47, el crecimiento tumoral experimentado por el grupo control fue rápido, de modo que ningún animal sobrevivió más allá del día 13 de experimento. Por el contrario, el grupo de ratones tratados con LUV-TRAIL sobrevivió hasta el día 18, mientras que el grupo

de tratamiento con LUVDOX-TRAIL 1/10 alcanzó el día 20 un total del 66,7% de los animales (4 de los 6 ratones que integraron el grupo).

Por otra parte, se realizó una medición periódica del volumen tumoral en todos los ratones de los distintos grupos incluidos en el experimento (Figura 4.48). Tal y como se observa en la Figura 4.48, el tratamiento con LUV-TRAIL mostró un efecto de ralentización en el crecimiento tumoral con respecto al grupo control, efecto que fue mucho más acentuado en los ratones tratados con LUVDOX-TRAIL 1/10.

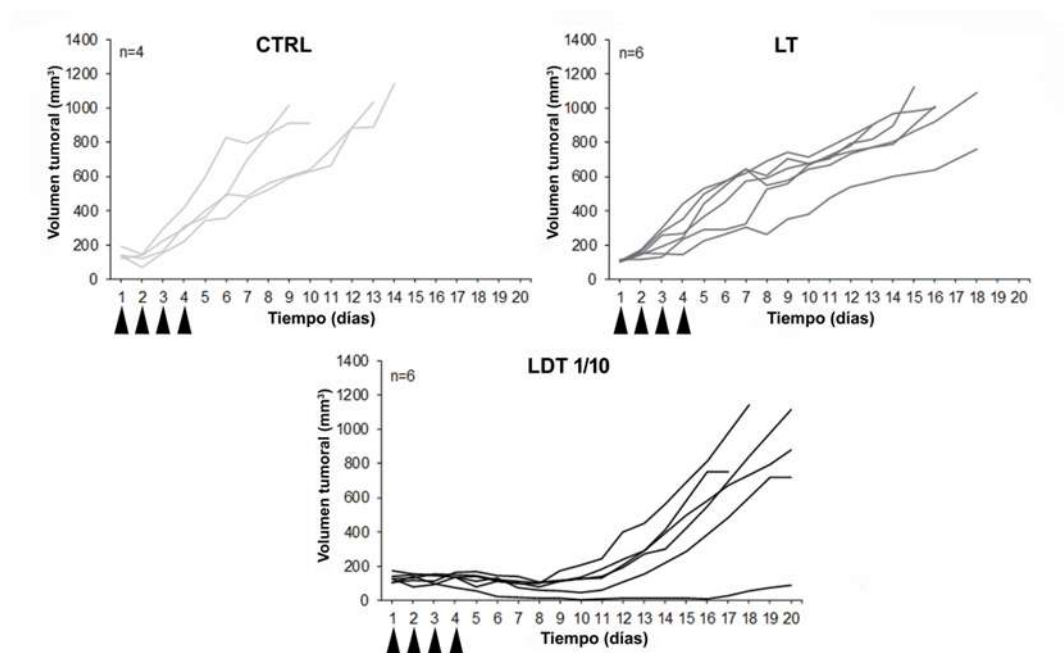


Figura 4.48 Crecimiento tumoral tras el tratamiento *in vivo* con LUVDOX-TRAIL 1/10. Los ratones con tumores xeno-gráficos fueron tratados durante 4 días con inyecciones intra-peritoneales de PBS (CTRL), LUV-TRAIL (LT, 36 µg de TRAIL/dosis) y LUVDOX-TRAIL 1/10 (LDT 1/10, 36 µg de TRAIL/dosis). El experimento se monitorizó durante 20 días. Crecimiento tumoral representado a partir de los volúmenes tumorales (Longitud x Altura x Profundidad) alcanzados a lo largo del tiempo.

Para comprobar objetivamente que se producía un retraso en el crecimiento tumoral tras el tratamiento con LUV-TRAIL y sobre todo con LUVDOX-TRAIL, se elaboró una representación tomando como referencia los tiempos en los que los distintos grupos de tratamiento alcanzaron un volumen de

tumor correspondiente al 25%, 50% y 75% del volumen final alcanzado en el momento de aplicar el criterio de punto final (Figura 4.49). De este modo, se observó que los grupos control y LUV-TRAIL alcanzaron el 25% y 50% del volumen final al mismo tiempo, pero se ralentizó de forma significativa el crecimiento a la hora de alcanzar el 75% del volumen final en el grupo de tratamiento con LUV-TRAIL con respecto al grupo control. Por otro lado, LUVDOX-TRAIL 1/10 frenó el tiempo en el que los animales tardaron en alcanzar el 25%, 50% y 75% del volumen final, mostrando diferencias significativas con respecto al control y al tratamiento con LUV-TRAIL.

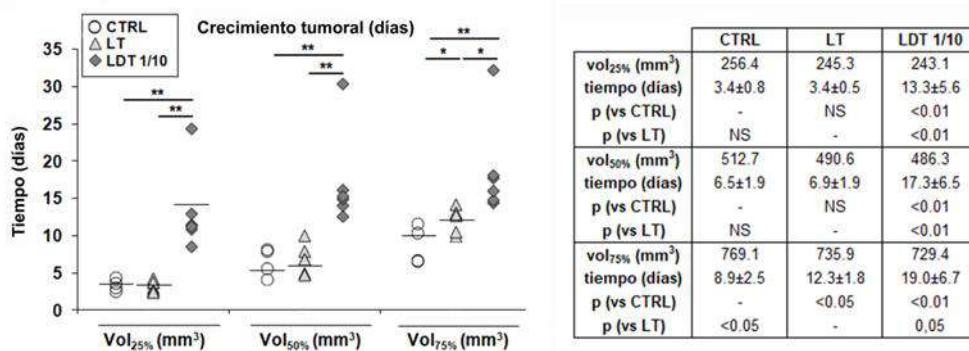


Figura 4.49 Valoración del crecimiento tumoral tras el tratamiento *in vivo* con LUVDOX-TRAIL 1/10. Análisis temporal del crecimiento tumoral, cuya representación muestra los días tardados en alcanzar el 25%, 50% y 75% del tamaño con respecto al volumen final en el momento del sacrificio de cada grupo de tratamiento. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Con los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* con LUVDOX-TRAIL, se puede concluir que la formulación LUVDOX-TRAIL 1/10 no sólo mostró una alta seguridad como tratamiento, sino que además produjo una ralentización en el crecimiento tumoral y un incremento en el porcentaje de supervivencia con respecto al tratamiento con LUV-TRAIL en el modelo animal tumoral estudiado. Estos datos pre-clínicos, por tanto, demuestran que LUVDOX-TRAIL tiene un elevado potencial como terapia anti-tumoral.

DISCUSIÓN GENERAL

5 DISCUSIÓN GENERAL

TRAIL, a diferencia de otros miembros de la familia del TNF, ha sido considerado un prometedor agente anti-tumoral desde que se describió su capacidad para inducir muerte celular de forma selectiva en las células tumorales, sin afectar a células sanas [108, 109]. TRAIL ha demostrado una gran seguridad durante la administración sistémica tanto en modelos animales, en contraposición a otros ligandos mortales con elevada hepatotoxicidad como FasL [223], como en humanos durante su uso en ensayos clínicos [225, 227]. Sin embargo, estos mismos ensayos clínicos realizados en pacientes con distintos tipos de cáncer no demostraron una evidente eficacia de TRAIL como tratamiento anti-tumoral tanto sólo como en combinación con otros tratamientos. Aunque no está claro completamente el porqué de esta limitada eficacia contra tumores en humanos, una de las causas podría ser el pobre perfil farmacocinético de la forma soluble de TRAIL empleada en algunos de los ensayos clínicos. Además, esta forma soluble posee un bajo nivel de entrecruzamiento que no facilita la adecuada agregación de los receptores mortales, requerida para la correcta activación de la señalización a través del receptor DR5, el principal receptor pro-apoptótico descrito en numerosos tipos de células tumorales [231]. De hecho, TRAIL no es secretado por las células efectoras del sistema inmune en su forma soluble, sino asociado a la superficie de los exosomas, lo que le proporciona un mayor potencial citotóxico [106, 107]. Esto podría implicar que terapias basadas en constructos de la proteína en forma transmembrana podrían ser una mejor aproximación como terapia anti-tumoral en comparación con las desarrolladas hasta la fecha y empleadas en ensayos clínicos que se han basado en la forma soluble del ligando mortal.

En este sentido, nuestro grupo ha sido pionero en el desarrollo de vesículas lipídicas artificiales, semejantes a los exosomas fisiológicos, con TRAIL anclado en la superficie, denominados LUV-TRAIL. Trabajos anteriores de nuestro grupo han demostrado que LUV-TRAIL presenta un mayor potencial apoptótico que la forma soluble del ligando sobre un amplio panel de células tumorales *in vitro*, así como un mayor efecto anti-tumoral *in vivo* [367]. Este mayor

efecto apoptótico por parte de LUV-TRAIL ha demostrado responder a una mayor habilidad de esta formulación para agrupar los receptores mortales, especialmente DR5, en estructuras supramoleculares induciendo un mayor reclutamiento del DISC, lo que conduce a una señalización apoptótica más potente y eficiente [141, 303, 307-310].

En este trabajo se ha querido ampliar el estudio desarrollado previamente por nuestro grupo sobre el potencial citotóxico de LUV-TRAIL utilizando el sarcoma como modelo tumoral, así como explorar la incorporación de otras drogas a esta formulación para mejorar su capacidad anti-tumoral.

5.1 Validación del efecto de LUV-TRAIL sobre líneas celulares de sarcoma

Las líneas celulares de sarcoma analizadas presentaron diferente sensibilidad a TRAIL dependiendo del tipo celular. Las líneas celulares RH4 y CADO-ES mostraron una total resistencia al efecto citotóxico de TRAIL, tanto en la forma soluble del ligando como acoplado a la superficie de liposomas en la formulación LUV-TRAIL. El análisis inicial de expresión de proteínas mostró niveles deficientes de la caspasa-8 en la línea celular RH4, mientras que las células CADO-ES mostraron una completa ausencia de esta caspasa iniciadora de la ruta extrínseca, lo que puede explicar su elevada resistencia al efecto de TRAIL observada a lo largo de todo el presente trabajo. Además, las células RH4 mostraron adicionalmente bajos niveles de Bid, lo que supone además que en este tipo celular la señalización apoptótica debida a la amplificación a través de la ruta mitocondrial estaría seriamente comprometida. Como ya se discutirá más adelante, estos resultados indican que aunque la formulación basada en el anclaje de TRAIL a la superficie de los liposomas es capaz en muchas ocasiones de superar la capacidad citotóxica de la forma soluble de este ligando, LUV-TRAIL necesita de la presencia de las mismas moléculas pro-apoptóticas intracelulares (caspasa-8 y Bid) que TRAIL soluble para ejercer su actividad apoptótica. Por el contrario, las células A673, HT1080 y RD mostraron diferente grado de sensibilidad al efecto citotóxico de TRAIL. Las células A673 se caracterizaron por ser altamente sensibles al potencial apoptótico de TRAIL de forma equivalente

tanto para TRAIL soluble como para LUV-TRAIL. Cabe destacar que la línea celular A673 fue la única línea celular analizada que presentó una expresión significativa del receptor DR4 en superficie, así como los niveles más elevados de expresión en superficie del receptor DR5 en comparación con las demás líneas celulares. La presencia del receptor DR4 podría explicar la alta sensibilidad a la forma soluble del ligando exclusivamente observada en las células A673, alcanzando niveles semejantes de muerte celular a los inducidos por LUV-TRAIL, que a su vez induciría apoptosis principalmente a través de DR5 tal y como se ha descrito en otros tipos de células tumorales [141, 310]. Por el contrario, las líneas celulares HT1080 y RD mostraron una menor sensibilidad a la forma soluble de TRAIL, la cual se vio aumentada por la formulación LUV-TRAIL con la que se consiguió una aceptable sensibilidad al efecto citotóxico de TRAIL. Como se ha constatado en trabajos anteriores, el anclaje del ligando mortal a la superficie de los liposomas podría potenciar el efecto citotóxico gracias al aumento de estabilidad de la proteína y a una distribución espacial que favorece la agrupación de los receptores mortales en la superficie celular de las células diana, especialmente requerida para la activación de la apoptosis a través de DR5 [141, 310].

Además, tal y como se ha indicado anteriormente, la muerte celular inducida por LUV-TRAIL requiere de la presencia de caspasa-8 y, en las células sensibles al efecto citotóxico de TRAIL, la acción citotóxica de LUV-TRAIL fue precisamente debida a la activación de la ruta extrínseca de la apoptosis iniciada por la caspasa-8, tal y como demuestran los resultados obtenidos en los experimentos de inhibición realizados en el presente trabajo tanto con el anticuerpo bloqueante de TRAIL, RIK, como con el inhibidor selectivo de caspasa-8, IETD-fmk. Esta activación de la cascada apoptótica se produjo de forma muy rápida en las células A673, donde LUV-TRAIL presentó una cinética de activación de la apoptosis más rápida que TRAIL soluble. Sin embargo, las células HT1080 y RD demostraron requerir tiempos más largos para la ejecución de la muerte apoptótica inducida por LUV-TRAIL.

Por otra parte, resulta interesante destacar que la apoptosis inducida por TRAIL en células sensibles mostró un perfil de muerte celular inmunogénica, tal y como indica la exposición de calreticulina observada en superficie, siendo estos niveles superiores en el tratamiento con LUV-TRAIL frente a la forma soluble del ligando. Este resultado sugiere que tanto TRAIL soluble como LUV-TRAIL podrían inducir muerte inmunogénica, aunque para demostrarlo es necesario analizar el efecto de la inmunización *in vivo* con células tumorales muertas por LUV-TRAIL o TRAIL soluble sobre el desarrollo tumoral. La muerte celular inmunogénica es una modalidad de muerte celular inducida y activada por determinados mecanismos, entre ellos la activación de caspasas y el estrés del retículo endoplásmico (ER) que estimula una respuesta inmune adaptativa a través de la exposición de antígenos en la superficie celular y la liberación de factores solubles por parte de las propias células muertas [406, 407]. La muerte celular inmunogénica constituye de este modo un mecanismo de inmunovigilancia tanto contra patógenos infecciosos como en el cáncer. Sin embargo, las células tumorales en ocasiones escapan de esta inmunovigilancia por defectos en la maquinaria molecular que subyace a la liberación de los adyuvantes endógenos requeridos para la activación de la respuesta inmune o por defectos en los mecanismos efectores inmunológicos [408, 409]. En este sentido, el empleo de terapias anti-tumorales que induzcan no sólo la muerte celular en las células cancerosas, sino que además activen la respuesta inmune del propio paciente contra el tumor ha demostrado ser un factor importante que contribuye al éxito a largo plazo de la terapia anti-tumoral [408]. Es por ello que, ante un hipotético uso futuro de la formulación LUV-TRAIL en ensayos clínicos, además de tratarse de una versión más citotóxica frente a células tumorales que la forma soluble de TRAIL, el hecho de que pudiera inducir una muerte celular inmunogénica contribuiría a facilitar la acción del sistema inmunológico del paciente frente al tumor que padece y se esté tratando.

La muerte celular inmunogénica depende del estrés de retículo ER y de la producción tras el mismo de especies reactivas de oxígeno (ROS) [410]. Existen evidencias que indican que el estrés de ER y los ROS activan sinérgicamente las vías de señalización de peligro y contribuyen a la movilización de los DAMP al

espacio extracelular [411], por lo que parece que la producción de estrés de ER y de los ROS asociados son importantes para la muerte celular inmunogénica y su inducción simultánea es fundamental para inducir la inmunogenicidad. Además, el estrés de ER y la producción de ROS mejoran considerablemente los diferentes tipos de emisión de DAMP. Por otra parte, el estrés de ER produce un aumento de la expresión del receptor pro-apoptótico DR5 [412], que de hecho junto con otros mecanismos, podrían sensibilizar a las células transformadas, y también no transformadas, a la muerte celular por TRAIL [209]. En este sentido, se ha descrito que determinados agentes inductores de estrés de retículo presentan un mecanismo citotóxico que, además de favorecer una muerte celular inmunogénica, produce una regulación positiva de DR5 [413].

Por otra parte, el estrés de ER no sólo está implicado en la inducción de muerte celular inmunogénica sino que también puede inducir una respuesta inflamatoria que contribuye a la inflamación crónica observada en cáncer y en otras afecciones. En este sentido, se ha descrito recientemente que el estrés de ER inicia la activación de NF- κ B y consecuentemente la inflamación a través del incremento de la expresión así como de la activación de los receptores de TRAIL [414]. Esta activación de los receptores de TRAIL tras el estrés de ER es independiente de la acción del ligando e induce la activación de NF- κ B dependiente de caspasa-8/FADD/RIPK1 dando lugar a la producción de citocinas inflamatorias. Es por ello que los receptores mortales de TRAIL pueden actuar como SAMP (patrones moleculares asociados al estrés, del inglés *Stress-Associated Molecular Patterns*). A la vista de esto, aunque la inducción de estrés de ER podría mejorar las terapias basadas en TRAIL dado el incremento de la expresión de los receptores mortales para este ligando, este mismo incremento de los receptores mortales de TRAIL también podría favorecer la inflamación crónica asociada a la génesis del cáncer. En este sentido, cabe recordar que aunque se ha implicado a TRAIL endógeno en los mecanismos de inmunovigilancia anti-tumoral, también se ha descrito que TRAIL endógeno autocrino tiene un papel pro-tumorigénico promoviendo la migración celular mediante la estimulación de DR5 expresando Rac1 que, a su vez, activa PI3K [122]. En definitiva, aunque la explotación de la señalización a través de la vía de

TRAIL y sus receptores puede seguir teniendo un gran potencial como tratamiento anti-tumoral, no debe perderse de vista su implicación en diversos mecanismos que pueden favorecer la generación de cáncer.

En cualquier caso, futuros estudios que profundicen en la relación entre la muerte celular inmunogénica inducida por LUV-TRAIL, su posible relación con el estrés de ER y la regulación positiva de DR5 que ésta conlleva, así como la posibilidad de combinar LUV-TRAIL con agentes inductores de ER y muerte celular inmunogénica serían de gran utilidad ya que, de este modo, una posible sensibilización intrínseca de LUV-TRAIL al efecto de TRAIL mediante un aumento de DR5 a través del estrés de ER, además de la demostrada inducción de muerte inmunogénica por LUV-TRAIL, haría de esta formulación un potente agente anti-tumoral *in vivo*, muy completo y eficaz con vistas al desarrollo de futuras terapias clínicas para pacientes con cáncer.

Finalmente, estudios del efecto de TRAIL a largo plazo sobre las células humanas de sarcoma demostraron que TRAIL no solo fue capaz de ejercer un efecto citotóxico inmediato sino que también produjo un descenso de la proliferación y supervivencia celular, siendo significativamente más potente en el caso de LUV-TRAIL, manifestando de nuevo ventajas en la forma transmembrana de la proteína frente a la forma soluble y apoyando con ello el hipotético uso de esta formulación en la clínica.

5.2 Optimización del efecto citotóxico de LUV-TRAIL a través de diferentes aproximaciones experimentales

5.2.1 Terapia combinada de TRAIL con agentes sensibilizantes

Tal y como se ha comentado anteriormente, en el presente trabajo se han explorado distintas aproximaciones experimentales para mejorar la capacidad anti-tumoral de LUV-TRAIL, ya sea funcionalizando dicha formulación como se discutirá más adelante, o bien mediante la combinación de LUV-TRAIL con distintos agentes sensibilizantes. A pesar de haber analizado 7 compuestos diferentes con potencial efecto sensibilizador descrito a la muerte inducida por

TRAIL a través de diferentes mecanismos (flavopiridol, doxorubicina, trabectedina, bortezomib, SNS-032, ácido valproico y FK228), en ningún caso se logró superar la resistencia a la apoptosis en las células analizadas resistentes a TRAIL, RH4 y CADO-ES. En vista de estos resultados, parece que ninguno de los mecanismos de sensibilización descritos para estos compuestos es capaz, en estos tipos celulares, de contrarrestar la ausencia de la maquinaria apoptótica, principalmente caspasa-8, necesaria para que LUV-TRAIL ejerza su acción citotóxica.

Por el contrario, el compuesto flavopiridol fue el que mejor respuesta sensibilizadora presentó en las líneas celulares de sarcoma analizadas sensibles a TRAIL, proporcionando una mejora en el perfil citotóxico para ambas formulaciones del ligando mortal, tanto TRAIL soluble como LUV-TRAIL, cuando se combinaron con flavopiridol. El incremento en el potencial apoptótico de TRAIL en combinación con flavopiridol en las células A673 se correlacionó con el descenso en los niveles de las proteínas anti-apoptóticas cFLIP y XIAP, mejorando principalmente la citotoxicidad de LUV-TRAIL. En el caso de las células HT1080 y RD, que mostraron una mayor sensibilidad al efecto citotóxico de TRAIL soluble y LUV-TRAIL en el tratamiento combinado con flavopiridol, este aumento de la citotoxicidad se correlacionó con el descenso de cFLIP. Aunque no se ha analizado en este trabajo, la inducción de estrés del ER mediada por flavopiridol [415] también podría potenciar el efecto de LUV-TRAIL tal y como se ha descrito previamente con TRAIL soluble y otros inductores de estrés de ER [209]. Asimismo, la muerte celular inducida por el tratamiento con ambas formulaciones de TRAIL combinadas o no con flavopiridol sobre las líneas celulares A673, HT1080 y RD, demostró ser eminentemente un proceso dependiente de caspasas donde, además de la activación de la ruta extrínseca de la apoptosis a través de la caspasa-8, también fue requerida la actividad de la caspasa-9 para la correcta ejecución del programa apoptótico, sugiriendo que las 3 líneas celulares son células de tipo II en lo referente a la muerte celular inducida por TRAIL. En cualquier caso, el mayor potencial apoptótico observado en el tratamiento combinado tanto de TRAIL soluble como de LUV-TRAIL con flavopiridol se correlacionó con un incremento en la activación de la señalización a

través de la ruta extrínseca de la apoptosis, lo que podría explicar la inducción de muerte celular mucho más eficiente para ambas formulaciones de TRAIL en combinación con flavopiridol. Asimismo, resultó interesante que este efecto potenciador de la capacidad citotóxica de TRAIL en combinación con flavopiridol no sólo se detectó a corto plazo, sino que en un análisis a largo plazo se demostró que el descenso en la proliferación y supervivencia celular ejercido por TRAIL soluble y principalmente LUV-TRAIL fue favorecido por la combinación con flavopiridol.

Por otro lado, la doxorrubicina proporcionó una ligera sensibilización a LUV-TRAIL en la línea celular A673, que podría responder a un ligero aumento de la expresión de DR5 en la membrana celular, mientras que la forma soluble del ligando fue la que más se benefició del tratamiento combinado con doxorrubicina en la línea celular HT1080. Por el contrario, la doxorrubicina no presentó ningún efecto sensibilizador a TRAIL sobre las células RD. A su vez, la trabectedina potenció la citotoxicidad de TRAIL soluble y LUV-TRAIL en las células A673, mientras que sólo mejoró la sensibilidad a TRAIL soluble en las células RD. Aunque se realizaron experimentos para discernir los mecanismos subyacentes a la sensibilización observada de las distintas formulaciones de TRAIL con los tratamientos combinados con doxorrubicina y trabectedina en las células A673, HT1080 y RD, no se pudo correlacionar el aumento de citotoxicidad de TRAIL observado con ninguno de los mecanismos analizados. Concretamente se llevó a cabo un análisis de la expresión de los receptores mortales en superficie, así como un análisis de expresión de las principales proteínas implicadas en la ruta de la apoptosis. Sin embargo, los resultados no mostraron cambios ni en los receptores ni en las proteínas analizadas a las concentraciones de agente sensibilizante empleadas. Por ello, serían necesarios estudios adicionales para discernir el mecanismo molecular subyacente a la sensibilización a LUV-TRAIL mediada por doxorrubicina y trabectedina. Estos estudios serían de gran utilidad para intentar optimizar la combinación de éstos y otros compuestos con LUV-TRAIL y mejorar en definitiva la capacidad anti-tumoral de estos compuestos.

Finalmente, los compuestos bortezomib y SNS-032 no produjeron una sensibilización significativa a los tratamientos con TRAIL soluble y LUV-TRAIL, a excepción de TRAIL soluble combinado con bortezomib en las células HT1080, que en ningún caso superó la muerte celular inducida por LUV-TRAIL solos.

Por otro lado, dado que el fenotipo de resistencia a la apoptosis en numerosas células tumorales está regulado por mecanismos epigenéticos en los que intervienen las enzimas HDAC [381], se analizó el efecto sensibilizador de los inhibidores de HDAC sobre TRAIL en líneas celulares de sarcoma. Este efecto ha sido descrito en algunas líneas celulares implicando un aumento en los niveles de expresión de los receptores pro-apoptóticos, en los niveles de expresión de las caspasas o debido a la disminución en la expresión de proteínas anti-apoptóticas [387-391]. Sorprendentemente, la combinación de TRAIL con los inhibidores de HDAC produjo un efecto negativo sobre la capacidad citotóxica de LUV-TRAIL en las células HT1080. Esta pérdida del potencial apoptótico, observada para LUV-TRAIL y no para la forma soluble del ligando, podría responder a cambios en los patrones de expresión y de localización de los receptores pro-apoptóticos de TRAIL que intervienen en la señalización de la apoptosis de forma diferencial en función de cómo se presente el ligando. Se ha descrito que la presencia de los receptores mortales en las balsas lipídicas es capaz de determinar la sensibilidad de las células tumorales a TRAIL [178, 179]. Es más, los receptores pro-apoptóticos DR4 y DR5 tienen diferente expresión en las balsas lipídicas y eso puede propiciar variaciones en la acción citotóxica de TRAIL. De hecho, en determinados tipos celulares tumorales, como en la leucemia linfocítica crónica, DR4 (y no DR5) se encuentra sobre todo en las balsas lipídicas y eso propicia que este tipo de tumores sean sensibles a TRAIL a través de la activación de DR4 [159]. Además, cabe destacar que en anteriores trabajos de nuestro grupo se describió la capacidad del ácido valproico, un inhibidor de HDAC usado como anti-convulsivante, de redistribuir y localizar el receptor DR4 en las balsas lipídicas en células de mieloma, restaurando así su sensibilidad a la apoptosis inducida por TRAIL soluble [158]. Dado que, como se ha mencionado anteriormente, TRAIL soluble principalmente induce apoptosis a través de DR4 mientras que LUV-TRAIL actúa activando DR5, es posible que en nuestros

experimentos los inhibidores de HDAC empleados estén redistribuyendo DR4 a las balsas lipídicas y no DR5. De este modo, la alteración en el balance de la presencia de los diferentes receptores en las balsas lipídicas favorecería la muerte inducida por TRAIL soluble, que señala a través de DR4, sin llegar a aumentar la sensibilidad de las células a esta formulación y perjudicaría a LUV-TRAIL en la muerte inducida a través de DR5. Sin embargo, un análisis más profundo del mecanismo implicado en los efectos observados usando estos inhibidores sería necesario para validar la hipótesis planteada sobre la relación entre la inhibición de HDAC y la distribución de DR4 y DR5 en las balsas lipídicas. En definitiva, conocer cómo esta distribución diferencial podría afectar a la citotoxicidad inducida por LUV-TRAIL sería de gran utilidad para aumentar la eficacia de LUV-TRAIL frente a las células tumorales.

5.2.2 Modificación de la composición lipídica de LUV-TRAIL

El cambio en las concentraciones de los diferentes componentes lipídicos de los liposomas se planteó inicialmente como un posible elemento potenciador del efecto apoptótico de LUV-TRAIL ya que podrían generar cambios en la homeostasis de membrana que pudieran afectar a patrones de fluidez, favoreciendo con ello la agrupación de los receptores y de este modo potenciar la señalización apoptótica.

La esfingomielina es uno de los componentes principales de las balsas lipídicas y constituye un elemento determinante en la estabilización de estas regiones como plataformas señalizadoras [396]. Teniendo en cuenta que los liposomas habitualmente empleados tienen una composición de esfingomielina en su estructura del 30%, se desarrollaron liposomas con 0%, 60% y 80% de esfingomielina en su composición para analizar cómo esta variación en la concentración de esfingomielina podía afectar a la acción citotóxica de LUV-TRAIL. Por otro lado, se han descrito mecanismos de sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL mediante la activación de PPAR γ , un ligando natural de la fosfatidilcolina que induce un aumento en los niveles de expresión de DR5 y una disminución de los niveles de cFLIP [397-399]. Es por ello que se

generaron LUV a diferentes concentraciones de fosfatidilcolina, concretamente con 5% y 96% de fosfatidilcolina en su composición, para analizar la posible mejora del potencial citotóxico en comparación con LUV-TRAIL clásicos, que contienen un 50% de fosfatidilcolina en su composición. Finalmente, se estudiaron las variaciones en las concentraciones de colesterol debido a que se ha descrito que este lípido, además de ser uno de los principales componentes de las balsas lipídicas, constituye un factor determinante en la fluidez e integridad de la membrana, contribuyendo con ello a la regulación de la señal apoptótica [175, 416]. Teniendo en cuenta que los liposomas clásicos presentan un 10% de colesterol en su composición, se generaron liposomas con 20%, 30%, 40% y 50% de colesterol para estudiar si variaciones en la cantidad de colesterol podían mejorar la citotoxicidad de LUV-TRAIL. El potencial anti-tumoral de LUV-TRAIL en las líneas celulares de sarcoma no sólo no mejoró variando la composición de esfingomielina, fosfatidilcolina y colesterol, sino que en algunos casos fue afectado negativamente. Esto es, parece que la composición clásica basada en las cantidades semejantes a las presentes en los exosomas fisiológicos constituye la composición más eficiente para la inducción de muerte celular a través de LUV-TRAIL. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en trabajos anteriores de nuestro grupo sobre líneas celulares tumorales de diferente origen [367]. Este hecho podría responder a que la incorporación lipídica que pudiera producirse en la membrana celular durante el proceso de acción de LUV-TRAIL podría no localizarse en las balsas lipídicas o traslocarse fuera de las mismas. De este modo, o bien no se variaría la composición de las balsas lipídicas o en caso de hacerlo, a causa de la alteración en el balance fisiológico de los diferentes componentes, no se favorecería la disposición lipídica óptima en el lugar específico donde se inicia la señalización apoptótica, en este caso por LUV-TRAIL.

Por otro lado, la incorporación del lípido artificial con capacidad anti-tumoral edelfosina a la composición lipídica de LUV-TRAIL (LUV-EDF-TRAIL) mostró una respuesta variable en función del tipo celular. En este sentido se observaron 4 patrones distintos de comportamiento en las células de sarcoma analizadas. En la línea celular A673 la incorporación de edelfosina a LUV-TRAIL

perjudicó el potencial citotóxico de TRAIL, mientras que en las células HT1080 la citotoxicidad no se vio afectada. Las células RH4 y CADO-ES, aunque son resistentes a TRAIL, fueron sensibles a LUV-EDF-TRAIL a expensas de la edelfosina que presentó un importante efecto citotóxico sobre ambas células, principalmente en la línea celular RH4. Finalmente, en las células RD se observó una mejora en el potencial citotóxico de LUV-TRAIL tras la incorporación de edelfosina. Esta variabilidad de resultados sobre el efecto citotóxico de LUV-EDF-TRAIL también se ha observado en trabajos anteriores de nuestro grupo sobre líneas celulares de cáncer de mama [367]. Del mismo modo, se observó que en la línea celular MDA-231 la incorporación de edelfosina en LUV-TRAIL no alteraba la capacidad citotóxica de los mismos, mientras que en las células MDA-468 y SKBR3 sí aumentó la citotoxicidad en comparación con LUV-TRAIL. Por el contrario, en la línea celular MCF7 la citotoxicidad observada en el tratamiento con LUV-EDF-TRAIL era debida fundamentalmente al efecto de la edelfosina.

No se pueden obtener conclusiones generalizadas sobre la funcionalización de LUV-TRAIL mediante la incorporación de edelfosina en su composición, ya que su efecto depende del tipo celular. Sin embargo, los resultados sugieren que el empleo de edelfosina podría mejorar la acción citotóxica de LUV-TRAIL en algunos tipos de tumores (como en las células RD), si bien se necesitarían estudios sobre el mecanismo de sensibilización con el fin de poder seleccionar los tumores que se beneficiarían de este efecto. En otros casos la edelfosina *per se* es capaz de matar células tumorales resistentes a TRAIL (y probablemente a otros tratamientos) como son las células CADO-ES y sobre todo las células RH4.

De forma adicional, se comprobó que la adición por separado de LUV-EDF a distintas concentraciones de edelfosina no mejoró de manera evidente la citotoxicidad de TRAIL (ni de la forma soluble ni de LUV-TRAIL) en ninguna línea celular, salvo en la línea celular RH4. Aunque la adición de LUV-EDF a ambas formulaciones de TRAIL no mejoró la citotoxicidad de éstas en las células RH4, estas células fueron muy sensibles a edelfosina, lo que concuerda con lo observado en los experimentos anteriores, siendo un dato más a favor del posible

uso de edelfosina como tratamiento anti-tumoral en algunos tipos de sarcoma resistentes a otros tratamientos. Por otro lado, en trabajos anteriores de nuestro grupo sobre células provenientes de otros tipos de tumores [367], se demostró que LUV-EDF no sólo tienen capacidad citotóxica sino que también tienen capacidad sensibilizadora a TRAIL soluble y LUV-TRAIL en las líneas celulares tumorales de mama MDA-231 y MDA-468, lo que muestra una vez más que el efecto de la edelfosina en particular, y de los agentes anti-tumorales en general, depende del tipo celular sobre el que se empleen.

Asimismo, la caracterización de la muerte celular inducida por LUV-EDF y LUV-EDF-TRAIL sobre las líneas celulares de sarcoma aportó diferentes resultados sobre el mecanismo subyacente a la citotoxicidad de LUV-EDF con TRAIL. Para dichos estudios se seleccionaron las células RH4 porque fueron muy sensibles al efecto de la edelfosina y las células RD porque fueron las únicas en las que se produce un efecto sensibilizador de edelfosina a TRAIL. En la línea celular RH4, totalmente resistente a TRAIL y muy sensible a edelfosina, la muerte inducida por las formulaciones LUV-EDF y LUV-EDF-TRAIL se debió, como era esperable, exclusivamente al efecto de la edelfosina, sin que interviniera TRAIL ni la vía extrínseca de la apoptosis. Además, la muerte celular que se produjo no fue sólo dependiente de caspasas, sino que también se pudo constatar un componente necroptótico, todo ello sin que interviniera la endocitosis mediada por dinamina. Por otro lado, en las células RD, caracterizadas por ser parcialmente sensibles a TRAIL y donde la edelfosina potenció su efecto, se evidenció una muerte celular inducida por LUV-EDF-TRAIL dependiente totalmente de la activación de caspasas, fundamentalmente a través de la vía extrínseca debido a la acción de TRAIL. En este caso, el mecanismo de acción sí parecía depender, al menos en parte, de la endocitosis dependiente de dinamina. Con esto, se puede concluir que la muerte celular inducida por la edelfosina no siempre es un proceso exclusivamente apoptótico, y en el caso concreto de la línea celular RD, la edelfosina aunque no parece intervenir en la muerte inducida por LUV-EDF-TRAIL, en la que no se observa un proceso de necroptosis, sí interviene en la sensibilización de las células RD a TRAIL, por un mecanismo todavía por

identificar completamente pero en el que sí interviene la endocitosis mediada por dinamina.

Por otra parte, el hecho de que las RH4 sean muy resistentes a agentes que inducen apoptosis (como TRAIL, tanto la forma soluble como LUV-TRAIL) pero que sean sensibles a agentes que producen necroptosis (como la edelfosina) abre las puertas a la exploración de tratamientos con agentes que induzcan otros tipos de muerte celular diferentes a la apoptosis, como la necroptosis en células tumorales altamente resistentes a una muerte celular por apoptosis.

5.2.3 Encapsulación de agentes sensibilizantes en el interior de LUV-TRAIL

La incorporación de fármacos en nanopartículas para la administración de tratamientos lleva décadas empleándose en terapia clínica dado que permite superar las limitaciones en la eficacia del fármaco administrado en forma libre, como es la ineficiencia del transporte a los tejidos así como la acumulación del compuesto en localizaciones no deseadas, afectando a tejidos sanos y generando efectos secundarios no deseados. En este sentido, los liposomas concretamente proporcionan una alternativa prometedora en este tipo de estrategias ya que, además de beneficiarse de una direccionalidad pasiva debido al efecto EPR, disponen de una gran habilidad para la encapsulación de compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos, una excelente biocompatibilidad y un elevado perfil farmacocinético [299, 313, 314]. De forma adicional a los lípidos que constituyen la bicapa lipídica, la incorporación de PEG a la composición liposomal proporciona ventajas a la formulación ya que proporciona una estabilización estérica mejorando la vida media en circulación [417-419].

En nuestro caso, la utilización de LUV-TRAIL para la vehiculización de agentes sensibilizantes que actúen en paralelo con la activación de la ruta extrínseca de la apoptosis a través de TRAIL fue una estrategia que se exploró como método para optimizar el tratamiento con LUV-TRAIL.

Inicialmente, se desarrolló un método de encapsulación de flavopiridol, lográndose con éxito la incorporación del agente flavopiridol en el interior de los

LUV y generando así la formulación LUV-FVP-TRAIL. Aunque la formulación en ausencia de TRAIL en superficie mostró muy baja citotoxicidad, LUV-FVP-TRAIL presentó valores de muerte celular muy elevados en todas las variables liposomales estudiadas, incluso en aquellas con ausencia de acidez en el lumen, que indicaría un bajo nivel de encapsulación. Este efecto se detectó en las dos líneas celulares analizadas, de forma independiente a los tiempos de encapsulación estudiados. Dado que la concentración inicial de flavopiridol de la que se partió en el proceso de encapsulación en los liposomas fue de 350 μM y teniendo en cuenta que la eficiencia de encapsulación alcanzó el 50% en el caso de LUV-AS CHOL y del 10% en LUV-PBS CHOL, dichas variaciones de LUV-FVP contendrían una concentración aproximada de flavopiridol en su interior de 175 μM y 35 μM respectivamente. Conociendo que la retención del flavopiridol disminuía un 60% a partir de las 2 horas, se estima que la concentración final de flavopiridol en LUV-FVP sería aproximadamente 105 μM en el caso de LUV-AS CHOL y 21 μM para LUV-PBS CHOL. En los experimentos de citotoxicidad, las células eran tratadas a una concentración final de TRAIL de 1 $\mu\text{g/ml}$, por lo que en el caso de LUV-FVP-TRAIL la concentración final aproximada de flavopiridol correspondiente a dicha cantidad de TRAIL sería de 8,74 μM para LUV-AS CHOL y 1,75 μM en el caso de LUV-PBS CHOL. Por lo tanto, estas concentraciones de flavopiridol con las que se incubaron las células HT1080 y RD correspondieron a valores mucho más altos que los empleados como dosis sub-tóxicas (50 nM en el caso de las células HT1080 y 200 nM en las células RD) en los experimentos combinatorios de flavopiridol con TRAIL, incluso en el caso de los LUV-PBS CHOL. Esto podría explicar cómo la cantidad de flavopiridol encapsulado en LUV-PBS CHOL podría ya haber sido suficiente para actuar en sinergia con TRAIL cuando éste estaba asociado a su superficie, produciendo valores de citotoxicidad muy elevados y comparables a los obtenidos con LUV-AS CHOL con TRAIL en su superficie. Sin embargo, esta hipótesis debería comprobarse en próximos trabajos realizando experimentos combinatorios de LUV-TRAIL con flavopiridol soluble a una concentración de 1,75 μM . Además, futuros estudios centrados en discernir el mecanismo de muerte celular que subyace al efecto citotóxico de LUV-FVP-TRAIL también serían necesarios para conocer qué tipo de muerte celular induce

esta formulación. En este sentido, la utilización de inhibidores que interfieran en los diferentes elementos de la ruta apoptótica (inhibidores de caspasas o de estrés de ER, proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 o antagonistas de los receptores de TRAIL) podría determinar el grado de contribución del flavopiridol a la muerte celular ejercida por LUV-FVP-TRAIL.

Por otra parte y debido a los prometedores resultados iniciales obtenidos en el proceso de encapsulación de la doxorrubicina en LUV-TRAIL, desarrollado y analizado por nuestro grupo en trabajos anteriores y que dio como resultado la generación de los denominados LUVDOX-TRAIL, se decidió ampliar el estudio con esta formulación. Por una parte se quiso analizar la capacidad de LUVDOX-TRAIL como tratamiento anti-tumoral en sarcomas y por otra, se quiso mejorar su perfil de seguridad manteniendo su actividad citotóxica frente a células tumorales.

Con respecto al primer punto, se confirmó el excepcional efecto citotóxico de la formulación LUVDOX-TRAIL, que responde a una activación más potente y rápida de la señalización de la ruta extrínseca de la apoptosis en comparación con LUV-TRAIL. Además, experimentos diseñados para determinar el mecanismo de acción de LUVDOX-TRAIL mediante la utilización de diferentes inhibidores determinaron que, de igual manera que lo observado para otras variaciones de LUV-TRAIL como fue LUV-EDF-TRAIL, la capacidad anti-tumoral de LUVDOX-TRAIL y el mecanismo subyacente variaban en función del tipo celular. Sin embargo, al igual que en casos anteriores, se observaron determinados patrones de comportamiento entre las distintas líneas celulares. Por un lado, en las células HT1080 y RD LUV-TRAIL mostraron una sinergia al combinarse con doxorrubicina en cualquiera de sus formulaciones (soluble, como LUVDOX o bien en la formulación única LUVDOX-TRAIL), siendo además una muerte dependiente de caspasas y fundamentalmente debida al efecto de TRAIL activando la ruta extrínseca. Además, en las células RD la endocitosis dependiente de dinamina parecía estar implicada en el mecanismo de acción de LUVDOX-TRAIL. Por otro lado, en las células resistentes a TRAIL, RH4 y CADO-ES, el efecto citotóxico producido por LUV-TRAIL en combinación con las distintas formulaciones de doxorrubicina se debió fundamentalmente al efecto de

doxorubicina, sin que TRAIL ni la ruta extrínseca intervinieran en la inducción de apoptosis. Además, en estas líneas celulares se observó como en algunos casos, doxorubicina inducía citotoxicidad mediante un mecanismo dependiente de caspasas, como fue el caso de las células RH4 tratadas con LUVDOX, así como en las combinaciones de LUV-TRAIL con LUVDOX o con doxorubicina soluble. Sin embargo, también se observó una muerte celular independiente de caspasas en el tratamiento de dichas células con LUVDOX-TRAIL y en todos los tratamientos analizados en el caso de las células CADO-ES.

Es reseñable que, en este caso, a diferencia de lo que ocurría con la edelfosina, las células RH4 fueron menos sensibles a la acción citotóxica de doxorubicina que las células CADO-ES, siendo estas últimas muy sensibles a doxorubicina. Sin embargo, al igual que ocurría con la edelfosina, las células sensibles al agente anti-tumoral (en este caso las células CADO-ES, sensibles a doxorubicina) presentaron una muerte celular inducida por un mecanismo independiente de caspasas. Este hallazgo de nuevo abre las puertas al uso de agentes que induzcan muerte celular por mecanismos diferentes a los dependientes de caspasas, como podría ser la necroptosis u otros, como tratamiento en células tumorales altamente resistentes a una muerte celular apoptótica.

Finalmente, las células A673, altamente sensibles al efecto citotóxico de TRAIL, presentaron una muerte celular inducida por las diferentes combinaciones de doxorubicina y TRAIL parcialmente dependiente de caspasas. En este caso se observó una contribución parcial de la ruta extrínseca dependiente de caspasas activada por TRAIL, pero también una inducción de muerte celular independiente de caspasas en donde la endocitosis dependiente de dinamina tiene un cierto grado de intervención.

Respecto a la mejora del perfil de seguridad de LUVDOX-TRAIL manteniendo su capacidad citotóxica frente a células tumorales, en estudios previos de nuestro grupo se observó que aunque LUVDOX-TRAIL era altamente citotóxico frente a una amplia variedad de líneas celulares tumorales, también se

constató que esta formulación era tóxica frente a células no transformadas. Por ello, se ajustó la concentración de doxorubicina presente en los liposomas a niveles que no mostraron citotoxicidad en células normales, manteniendo la misma concentración de TRAIL anclado a su superficie. Así se obtuvieron unos liposomas con 10 veces menos concentración de doxorubicina en el lumen, denominados LUVDOX-TRAIL (1/10). Fue con la formulación LUVDOX-TRAIL (1/10) con la que se quiso corroborar *ex vivo* en células tumorales primarias aisladas de pacientes con sarcoma así como *in vivo* en un modelo animal de xeno-injerto tumoral, el potencial anti-tumoral de la formulación LUVDOX-TRAIL previamente observado *in vitro* sobre líneas celulares de sarcoma. La formulación LUVDOX-TRAIL (1/10) mantuvo un elevado potencial citotóxico *in vitro* en líneas celulares de sarcoma, siendo la formulación desarrollada más potente en la inducción de apoptosis *ex vivo* en células tumorales primarias procedentes de pacientes con diferentes tipos de sarcoma. Finalmente, los experimentos *in vivo* basados en el tratamiento de un modelo tumoral de sarcoma con LUVDOX-TRAIL (1/10) demostraron por una parte, ser seguros y no generar una toxicidad manifiesta tras la administración sistémica y por otra, demostraron un significativo efecto anti-tumoral. El aspecto de la seguridad de LUVDOX-TRAIL (1/10) como tratamiento se validó analizando los principales efectos de toxicidad descritos para TRAIL (toxicidad hepática) y para doxorubicina (toxicidad cardíaca) mediante la medición de la actividad de enzimas relacionadas con estos órganos, así como a través de imágenes histológicas de diversos órganos, en los que no se observó una toxicidad manifiesta. Asimismo, el efecto anti-tumoral de los LUVDOX-TRAIL (1/10) se puso de manifiesto constatando una ralentización significativa del crecimiento tumoral y la prolongación de la vida media de los animales tratados con dicha formulación de forma significativa con respecto al tratamiento con LUV-TRAIL clásicos.

Por todo ello, los prometedores resultados obtenidos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* con la formulación LUVDOX-TRAIL (1/10) asientan las bases pre-clínicas para el estudio de esta formulación como posible agente anti-tumoral en el tratamiento para determinados tipos de sarcomas.

CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten obtener las siguientes conclusiones:

1. LUV-TRAIL presenta un mayor potencial citotóxico que TRAIL soluble en las líneas celulares de sarcoma analizadas sensibles a TRAIL, a excepción de las células A673 que muestran semejante sensibilidad a ambas formulaciones, siendo la muerte celular inducida por LUV-TRAIL totalmente dependiente de TRAIL a través de la activación de la ruta extrínseca de la apoptosis.
2. TRAIL induce el marcador de muerte celular inmunogénica, calreticulina, en la superficie celular en las líneas celulares de sarcoma, siendo los niveles de exposición más elevados en LUV-TRAIL en comparación con TRAIL soluble.
3. El inhibidor de CDKs flavopiridol es el compuesto que mostró mayor sinergia en los tratamientos combinados con TRAIL soluble y LUV-TRAIL analizados en líneas celulares de sarcoma; esta sinergia se correlaciona con la regulación negativa de las proteínas anti-apoptóticas cFLIP (en las líneas celulares HT1080 y RD) y XIAP (en la línea celular A673).
4. El tratamiento combinado de TRAIL y flavopiridol potencia la citotoxicidad de TRAIL soluble y LUV-TRAIL, la cual se correlaciona con una activación más eficiente de la ruta extrínseca de la apoptosis, mostrando efectos a largo plazo en el descenso en la proliferación y supervivencia celular en líneas celulares de sarcoma.
5. Los inhibidores de HDAC no muestran un efecto sensibilizador a TRAIL soluble ni LUV-TRAIL en ninguna de las líneas celulares de sarcoma analizadas.
6. Las variaciones analizadas en la composición lipídica de esfingomielina, fosfatidilcolina y colesterol no muestran ningún efecto potenciador de la citotoxicidad de LUV-TRAIL.
7. La incorporación de edelfosina a la composición de LUV-TRAIL mejora la capacidad citotóxica de LUV-TRAIL en algunas líneas celulares de sarcoma.

8. Es posible la encapsulación de flavopiridol en el lumen de los LUV obteniendo la formulación LUV-FVP con una eficiencia de encapsulación del 50%. Los LUV-FVP-TRAIL, obtenidos tras la posterior unión a la superficie de TRAIL, muestran un elevado potencial citotóxico en líneas celulares de sarcoma analizadas, mayor que LUV-TRAIL.
9. LUVDOX-TRAIL muestra un mayor potencial citotóxico y una mejor cinética de activación de la apoptosis con respecto a LUV-TRAIL en líneas celulares de sarcoma, induciendo una muerte celular dependiente de la activación de las principales caspasas implicadas en la ruta extrínseca de la apoptosis en las líneas celulares sensibles a TRAIL.
10. LUVDOX-TRAIL (1/10) induce apoptosis en células tumorales primarias derivadas de pacientes con sarcoma de forma más eficaz que TRAIL soluble y LUV-TRAIL.
11. La administración de LUVDOX-TRAIL (1/10) *in vivo* como tratamiento anti-tumoral no presenta efectos tóxicos tras su administración sistémica y muestra una eficaz actividad anti-tumoral en un modelo animal de xeno-injerto tumoral de sarcoma; LUVDOX-TRAIL (1/10) ralentiza el crecimiento tumoral y prolonga la vida media de los animales de forma significativa con respecto al tratamiento con LUV-TRAIL.

BIBLIOGRAFÍA

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Vogt, C., *Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelerkröete (Alyte obstetricans)*. Solothurn: Jent und Gassman, 1842: p. 130.
2. Weismann, A., *Die nachembryonale Entwicklung der Musciden nach Beobachtungen an Musca vomitoria und Sarcophaga carnaria*. Z Wiss Zool, 1864. **14**: p. 187-336.
3. Flemming, W., *Über die Bildung von Richtungsfiguren in Saugethiereiern beim Untergang Graaf'scher Follikel*. Arch Anat Physiol., 1885: p. 221-244.
4. Recklinghausen, F.v., *Unter suchungen über Rachitis und Osteomalacie*. Jena, Verlag Gustav Fischer, 1910.
5. Lockshin, R.A. and C.M. Williams, *Programmed cell death-II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmooths*. Journal of Insect Physiology, 1964. **10**(4): p. 643-649.
6. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
7. Schweichel, J.U. and H.J. Merker, *The morphology of various types of cell death in prenatal tissues*. Teratology, 1973. **7**(3): p. 253-66.
8. Ellis, H.M. and H.R. Horvitz, *Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans*. Cell, 1986. **44**(6): p. 817-29.
9. Yuan, J., et al., *The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme*. Cell, 1993. **75**(4): p. 641-52.
10. Yan, N. and Y. Shi, *Mechanisms of apoptosis through structural biology*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. **21**: p. 35-56.
11. Kroemer, G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009*. Cell Death Differ, 2009. **16**(1): p. 3-11.
12. Wyllie, A.H., J.F. Kerr, and A.R. Currie, *Cell death: the significance of apoptosis*. Int Rev Cytol, 1980. **68**: p. 251-306.
13. Fadok, V.A., et al., *Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages*. J Immunol, 1992. **148**(7): p. 2207-16.

14. Taylor, R.C., S.P. Cullen, and S.J. Martin, *Apoptosis: controlled demolition at the cellular level*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(3): p. 231-41.
15. Fadeel, B., S. Orrenius, and B. Zhivotovsky, *Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony?* Biochem Biophys Res Commun, 1999. **266**(3): p. 699-717.
16. Alnemri, E.S., et al., *Human ICE/CED-3 protease nomenclature*. Cell, 1996. **87**(2): p. 171.
17. Lamkanfi, M., et al., *Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man*. Cell Death Differ, 2002. **9**(4): p. 358-61.
18. Meister, N., et al., *Interferon-gamma mediated up-regulation of caspase-8 sensitizes medulloblastoma cells to radio- and chemotherapy*. Eur J Cancer, 2007. **43**(12): p. 1833-41.
19. Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann, *Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 383-424.
20. Salvesen, G.S. and V.M. Dixit, *Caspase activation: the induced-proximity model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 10964-7.
21. Chen, M. and J. Wang, *Initiator caspases in apoptosis signaling pathways*. Apoptosis, 2002. **7**(4): p. 313-9.
22. Riedl, S.J. and Y. Shi, *Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(11): p. 897-907.
23. Milhas, D., et al., *Caspase-10 triggers Bid cleavage and caspase cascade activation in FasL-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2005. **280**(20): p. 19836-42.
24. Ray, C.A., et al., *Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme*. Cell, 1992. **69**(4): p. 597-604.
25. Crook, N.E., R.J. Clem, and L.K. Miller, *An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif*. J Virol, 1993. **67**(4): p. 2168-74.
26. Oberoi, T.K., et al., *IAPs regulate the plasticity of cell migration by directly targeting Rac1 for degradation*. Embo j, 2012. **31**(1): p. 14-28.
27. Lopez, J., et al., *CARD-mediated autoinhibition of cIAP1's E3 ligase activity suppresses cell proliferation and migration*. Mol Cell, 2011. **42**(5): p. 569-83.

28. Huang, X., et al., *XIAP inhibits autophagy via XIAP-Mdm2-p53 signalling*. *Embo j*, 2013. **32**(16): p. 2204-16.
29. Roy, N., et al., *The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases*. *Embo j*, 1997. **16**(23): p. 6914-25.
30. Holcik, M. and R.G. Korneluk, *XIAP, the guardian angel*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(7): p. 550-6.
31. Bratton, S.B., et al., *XIAP inhibition of caspase-3 preserves its association with the Apaf-1 apoptosome and prevents CD95- and Bax-induced apoptosis*. *Cell Death Differ*, 2002. **9**(9): p. 881-92.
32. Vaux, D.L. and J. Silke, *IAPs, RINGs and ubiquitylation*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**(4): p. 287-97.
33. Irmeler, M., et al., *Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP*. *Nature*, 1997. **388**(6638): p. 190-5.
34. Safa, A.R., T.W. Day, and C.H. Wu, *Cellular FLICE-like inhibitory protein (C-FLIP): a novel target for cancer therapy*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2008. **8**(1): p. 37-46.
35. Micheau, O., *Cellular FLICE-inhibitory protein: an attractive therapeutic target?* *Expert Opin Ther Targets*, 2003. **7**(4): p. 559-73.
36. McLornan, D.P., et al., *Prognostic significance of TRAIL signaling molecules in stage II and III colorectal cancer*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(13): p. 3442-51.
37. Ullenhag, G.J., et al., *Overexpression of FLIPL is an independent marker of poor prognosis in colorectal cancer patients*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(17): p. 5070-5.
38. Korkolopoulou, P., et al., *c-FLIP expression in bladder urothelial carcinomas: its role in resistance to Fas-mediated apoptosis and clinicopathologic correlations*. *Urology*, 2004. **63**(6): p. 1198-204.
39. Wang, W., et al., *The relationship between c-FLIP expression and human papillomavirus E2 gene disruption in cervical carcinogenesis*. *Gynecol Oncol*, 2007. **105**(3): p. 571-7.
40. Valnet-Rabier, M.B., et al., *c-Flip protein expression in Burkitt's lymphomas is associated with a poor clinical outcome*. *Br J Haematol*, 2005. **128**(6): p. 767-73.

41. Valente, G., et al., *cFLIP expression correlates with tumour progression and patient outcome in non-Hodgkin lymphomas of low grade of malignancy*. Br J Haematol, 2006. **132**(5): p. 560-70.
42. Li, X., et al., *Overexpression of cFLIP in head and neck squamous cell carcinoma and its clinicopathologic correlations*. J Cancer Res Clin Oncol, 2008. **134**(5): p. 609-15.
43. Du, X., et al., *Expression and biological significance of c-FLIP in human hepatocellular carcinomas*. J Exp Clin Cancer Res, 2009. **28**: p. 24.
44. Zhou, X.D., et al., *Overexpression of cellular FLICE-inhibitory protein (FLIP) in gastric adenocarcinoma*. Clin Sci (Lond), 2004. **106**(4): p. 397-405.
45. Ueffing, N., et al., *A single nucleotide polymorphism determines protein isoform production of the human c-FLIP protein*. Blood, 2009. **114**(3): p. 572-9.
46. Chaudhary, P.M., et al., *Activation of the NF-kappaB pathway by caspase 8 and its homologs*. Oncogene, 2000. **19**(39): p. 4451-60.
47. Broker, L.E., F.A. Kruyt, and G. Giaccone, *Cell death independent of caspases: a review*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(9): p. 3155-62.
48. Callus, B.A. and D.L. Vaux, *Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical*. Cell Death Differ, 2007. **14**(1): p. 73-8.
49. Kale, J., E.J. Osterlund, and D.W. Andrews, *BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death*. Cell Death Differ, 2018. **25**(1): p. 65-80.
50. Youle, R.J. and A. Strasser, *The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(1): p. 47-59.
51. Green, D.R. and J.C. Reed, *Mitochondria and apoptosis*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1309-12.
52. Vousden, K.H. and X. Lu, *Live or let die: the cell's response to p53*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 594-604.
53. Henry-Mowatt, J., et al., *Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2850-60.
54. Zhang, X.D., et al., *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of human melanoma is regulated by smac/DIABLO release from mitochondria*. Cancer Res, 2001. **61**(19): p. 7339-48.

55. Chawla-Sarkar, M., et al., *Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis*. Cell Death Differ, 2004. **11**(8): p. 915-23.
56. Paulsen, M., et al., *Interaction with XIAP prevents full caspase-3/-7 activation in proliferating human T lymphocytes*. Eur J Immunol, 2008. **38**(7): p. 1979-87.
57. Vogler, M., et al., *Targeting XIAP bypasses Bcl-2-mediated resistance to TRAIL and cooperates with TRAIL to suppress pancreatic cancer growth in vitro and in vivo*. Cancer Res, 2008. **68**(19): p. 7956-65.
58. Chai, J., et al., *Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO*. Nature, 2000. **406**(6798): p. 855-62.
59. Kersse, K., et al., *The death-fold superfamily of homotypic interaction motifs*. Trends Biochem Sci, 2011. **36**(10): p. 541-52.
60. Cosman, D., *A family of ligands for the TNF receptor superfamily*. Stem Cells, 1994. **12**(5): p. 440-55.
61. Bossen, C., et al., *Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human*. J Biol Chem, 2006. **281**(20): p. 13964-71.
62. Clancy, L., et al., *Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(50): p. 18099-104.
63. Chan, F.K., *Three is better than one: pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling*. Cytokine, 2007. **37**(2): p. 101-7.
64. Naval, J., et al., *Importance of TRAIL Molecular Anatomy in Receptor Oligomerization and Signaling. Implications for Cancer Therapy*. Cancers (Basel), 2019. **11**(4).
65. Chinnaiyan, A.M., et al., *FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis*. Cell, 1995. **81**(4): p. 505-12.
66. Dickens, L.S., et al., *The 'complexities' of life and death: death receptor signalling platforms*. Exp Cell Res, 2012. **318**(11): p. 1269-77.
67. Gerlach, B., et al., *Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling*. Nature, 2011. **471**(7340): p. 591-6.

68. Tokunaga, F. and K. Iwai, *LUBAC, a novel ubiquitin ligase for linear ubiquitination, is crucial for inflammation and immune responses*. Microbes Infect, 2012. **14**(7-8): p. 563-72.
69. Degli-Esposti, M.A., et al., *Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family*. J Exp Med, 1997. **186**(7): p. 1165-70.
70. Walczak, H., *TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer*. Immunol Rev, 2011. **244**(1): p. 9-28.
71. Chaudhary, P.M., et al., *Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 821-30.
72. Walczak, H., et al., *TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL*. Embo j, 1997. **16**(17): p. 5386-97.
73. Bodmer, J.L., et al., *TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(4): p. 241-3.
74. Kuang, A.A., et al., *FADD is required for DR4- and DR5-mediated apoptosis: lack of trail-induced apoptosis in FADD-deficient mouse embryonic fibroblasts*. J Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25065-8.
75. Kischkel, F.C., et al., *Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5*. Immunity, 2000. **12**(6): p. 611-20.
76. Peter, M.E., *The TRAIL DISCUSSION: It is FADD and caspase-8!* Cell Death Differ, 2000. **7**(9): p. 759-60.
77. Li, H., et al., *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis*. Cell, 1998. **94**(4): p. 491-501.
78. Luo, X., et al., *Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors*. Cell, 1998. **94**(4): p. 481-90.
79. Wei, M.C., et al., *tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c*. Genes Dev, 2000. **14**(16): p. 2060-71.
80. Kantari, C. and H. Walczak, *Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(4): p. 558-63.
81. Scaffidi, C., et al., *Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways*. Embo J, 1998. **17**(6): p. 1675-87.

82. Ozoren, N. and W.S. El-Deiry, *Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL*. Neoplasia, 2002. **4**(6): p. 551-7.
83. Rudner, J., et al., *Type I and type II reactions in TRAIL-induced apoptosis - results from dose-response studies*. Oncogene, 2005. **24**(1): p. 130-40.
84. van Raam, B.J. and G.S. Salvesen, *Proliferative versus apoptotic functions of caspase-8 Hetero or homo: the caspase-8 dimer controls cell fate*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1824**(1): p. 113-22.
85. Declercq, W., T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele, *RIP kinases at the crossroads of cell death and survival*. Cell, 2009. **138**(2): p. 229-32.
86. Oberst, A. and D.R. Green, *It cuts both ways: reconciling the dual roles of caspase 8 in cell death and survival*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(11): p. 757-63.
87. Dillon, C.P., et al., *Survival function of the FADD-CASPASE-8-cFLIP(L) complex*. Cell Rep, 2012. **1**(5): p. 401-7.
88. Golstein, P. and G. Kroemer, *Cell death by necrosis: towards a molecular definition*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(1): p. 37-43.
89. Feoktistova, M. and M. Leverkus, *Programmed necrosis and necroptosis signalling*. Febs j, 2015. **282**(1): p. 19-31.
90. Vanden Berghe, T., et al., *Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(2): p. 135-47.
91. Boise, L.H. and C.M. Collins, *Salmonella-induced cell death: apoptosis, necrosis or programmed cell death?* Trends Microbiol, 2001. **9**(2): p. 64-7.
92. Fink, S.L. and B.T. Cookson, *Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells*. Infect Immun, 2005. **73**(4): p. 1907-16.
93. Kovacs, S.B. and E.A. Miao, *Gasdermins: Effectors of Pyroptosis*. Trends Cell Biol, 2017. **27**(9): p. 673-684.
94. Hersh, D., et al., *The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2396-401.
95. Degterev, A., et al., *Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury*. Nat Chem Biol, 2005. **1**(2): p. 112-9.

96. Li, J., et al., *The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis*. Cell, 2012. **150**(2): p. 339-50.
97. Holler, N., et al., *Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule*. Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 489-95.
98. Oliveira, S.R., J.D. Amaral, and C.M.P. Rodrigues, *Mechanism and disease implications of necroptosis and neuronal inflammation*. Cell Death Dis, 2018. **9**(9): p. 903.
99. Wang, H., et al., *Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3*. Mol Cell, 2014. **54**(1): p. 133-146.
100. Kayagaki, N., et al., *Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells*. J Immunol, 1999. **163**(4): p. 1906-13.
101. Fanger, N.A., et al., *Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)*. J Exp Med, 1999. **190**(8): p. 1155-64.
102. Griffith, T.S., et al., *Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL*. J Exp Med, 1999. **189**(8): p. 1343-54.
103. Hymowitz, S.G., et al., *Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5*. Mol Cell, 1999. **4**(4): p. 563-71.
104. Hymowitz, S.G., et al., *A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL*. Biochemistry, 2000. **39**(4): p. 633-40.
105. Cha, S.S., et al., *2.8 Å resolution crystal structure of human TRAIL, a cytokine with selective antitumor activity*. Immunity, 1999. **11**(2): p. 253-61.
106. Martinez-Lorenzo, M.J., et al., *Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles*. J Immunol, 1999. **163**(3): p. 1274-81.
107. Monleon, I., et al., *Differential secretion of Fas ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells*. J Immunol, 2001. **167**(12): p. 6736-44.

108. Wiley, S.R., et al., *Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis*. Immunity, 1995. **3**(6): p. 673-82.
109. Pitti, R.M., et al., *Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family*. J Biol Chem, 1996. **271**(22): p. 12687-90.
110. Sedger, L.M., et al., *Characterization of the in vivo function of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L gene-deficient mice*. Eur J Immunol, 2002. **32**(8): p. 2246-54.
111. Diehl, G.E., et al., *TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses*. Immunity, 2004. **21**(6): p. 877-89.
112. Cretney, E., et al., *Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice*. J Immunol, 2002. **168**(3): p. 1356-61.
113. Lamhamedi-Cherradi, S.E., et al., *Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL-/- mice*. Nat Immunol, 2003. **4**(3): p. 255-60.
114. Mi, Q.S., et al., *Blockade of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand exacerbates type 1 diabetes in NOD mice*. Diabetes, 2003. **52**(8): p. 1967-75.
115. Cretney, E., et al., *TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in mice*. Immunol Cell Biol, 2005. **83**(5): p. 511-9.
116. Anel, A., et al., *Apo2L/TRAIL and immune regulation*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 2074-84.
117. Finnberg, N., A.J. Klein-Szanto, and W.S. El-Deiry, *TRAIL-R deficiency in mice promotes susceptibility to chronic inflammation and tumorigenesis*. J Clin Invest, 2008. **118**(1): p. 111-23.
118. Zerafa, N., et al., *Cutting edge: TRAIL deficiency accelerates hematological malignancies*. J Immunol, 2005. **175**(9): p. 5586-90.
119. Takeda, K., et al., *Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells*. Nat Med, 2001. **7**(1): p. 94-100.
120. Grosse-Wilde, A., et al., *TRAIL-R deficiency in mice enhances lymph node metastasis without affecting primary tumor development*. J Clin Invest, 2008. **118**(1): p. 100-10.

121. Takeda, K., et al., *Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth*. Cell Immunol, 2001. **214**(2): p. 194-200.
122. von Karstedt, S., et al., *Cancer cell-autonomous TRAIL-R signaling promotes KRAS-driven cancer progression, invasion, and metastasis*. Cancer Cell, 2015. **27**(4): p. 561-73.
123. von Karstedt, S., A. Montinaro, and H. Walczak, *Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy*. Nat Rev Cancer, 2017. **17**(6): p. 352-366.
124. Pan, G., et al., *The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL*. Science, 1997. **276**(5309): p. 111-3.
125. Marsters, S.A., et al., *A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain*. Curr Biol, 1997. **7**(12): p. 1003-6.
126. Emery, J.G., et al., *Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL*. J Biol Chem, 1998. **273**(23): p. 14363-7.
127. Wallach, D., et al., *Cell death induction by receptors of the TNF family: towards a molecular understanding*. FEBS Lett, 1997. **410**(1): p. 96-106.
128. Degli-Esposti, M.A., et al., *The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 813-20.
129. Labrinidis, A., et al., *Does Apo2L/TRAIL play any physiologic role in osteoclastogenesis?* : Blood. 2008 Jun 1;111(11):5411-2; autor reply 5413. doi: 10.1182/blood-2008-03-144261.
130. Holen, I., et al., *Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells*. Cancer Res, 2002. **62**(6): p. 1619-23.
131. Siegel, R.M., et al., *Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations*. Science, 2000. **288**(5475): p. 2354-7.
132. Holler, N., et al., *Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(4): p. 1428-40.
133. Kelley, S.K. and A. Ashkenazi, *Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL*. Curr Opin Pharmacol, 2004. **4**(4): p. 333-9.

134. van der Sloot, A.M., et al., *Designed tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand variants initiating apoptosis exclusively via the DR5 receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(23): p. 8634-9.
135. MacFarlane, M., et al., *Chronic lymphocytic leukemic cells exhibit apoptotic signaling via TRAIL-R1*. Cell Death Differ, 2005. **12**(7): p. 773-82.
136. MacFarlane, M., et al., *TRAIL receptor-selective mutants signal to apoptosis via TRAIL-R1 in primary lymphoid malignancies*. Cancer Res, 2005. **65**(24): p. 11265-70.
137. Szegezdi, E., et al., *Targeting AML through DR4 with a novel variant of rhTRAIL*. J Cell Mol Med, 2011. **15**(10): p. 2216-31.
138. Lemke, J., et al., *TRAIL signaling is mediated by DR4 in pancreatic tumor cells despite the expression of functional DR5*. J Mol Med (Berl), 2010. **88**(7): p. 729-40.
139. Holland, P.M., *Targeting Apo2L/TRAIL receptors by soluble Apo2L/TRAIL*. Cancer Lett, 2013. **332**(2): p. 156-62.
140. Truneh, A., et al., *Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor*. J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 23319-25.
141. De Miguel, D., et al., *Liposome-bound TRAIL induces superior DR5 clustering and enhanced DISC recruitment in histiocytic lymphoma U937 cells*. Leuk Res, 2015. **39**(6): p. 657-66.
142. Muhlenbeck, F., et al., *The tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 have distinct cross-linking requirements for initiation of apoptosis and are non-redundant in JNK activation*. J Biol Chem, 2000. **275**(41): p. 32208-13.
143. Wajant, H., et al., *Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative*. Oncogene, 2001. **20**(30): p. 4101-6.
144. Bodmer, J.L., P. Schneider, and J. Tschopp, *The molecular architecture of the TNF superfamily*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(1): p. 19-26.
145. Bodmer, J.L., et al., *Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL*. J Biol Chem, 2000. **275**(27): p. 20632-7.
146. Henkler, F., et al., *The extracellular domains of FasL and Fas are sufficient for the formation of supramolecular FasL-Fas clusters of high stability*. J Cell Biol, 2005. **168**(7): p. 1087-98.

147. Berg, D., et al., *Enforced covalent trimerization increases the activity of the TNF ligand family members TRAIL and CD95L*. Cell Death Differ, 2007. **14**(12): p. 2021-34.
148. Schneider, P., et al., *Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity*. J Exp Med, 1998. **187**(8): p. 1205-13.
149. Grell, M., et al., *The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor*. Cell, 1995. **83**(5): p. 793-802.
150. Scott, F.L., et al., *The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering*. Nature, 2009. **457**(7232): p. 1019-22.
151. LA, O.R., et al., *Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis*. Nature, 2009. **461**(7264): p. 659-63.
152. Pan, L., et al., *Higher-Order Clustering of the Transmembrane Anchor of DR5 Drives Signaling*. Cell, 2019. **176**(6): p. 1477-1489.e14.
153. Carrington, P.E., et al., *The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8*. Mol Cell, 2006. **22**(5): p. 599-610.
154. Dickens, L.S., et al., *A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death*. Mol Cell, 2012. **47**(2): p. 291-305.
155. Horn, S., et al., *Caspase-10 Negatively Regulates Caspase-8-Mediated Cell Death, Switching the Response to CD95L in Favor of NF-kappaB Activation and Cell Survival*. Cell Rep, 2017. **19**(4): p. 785-797.
156. Hughes, M.A., et al., *Co-operative and Hierarchical Binding of c-FLIP and Caspase-8: A Unified Model Defines How c-FLIP Isoforms Differentially Control Cell Fate*. Mol Cell, 2016. **61**(6): p. 834-49.
157. Fischer, R., et al., *Novel strategies to mimic transmembrane tumor necrosis factor-dependent activation of tumor necrosis factor receptor 2*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 6607.
158. Gomez-Benito, M., et al., *Membrane expression of DR4, DR5 and caspase-8 levels, but not Mcl-1, determine sensitivity of human myeloma cells to Apo2L/TRAIL*. Exp Cell Res, 2007. **313**(11): p. 2378-88.
159. Marconi, M., et al., *Constitutive localization of DR4 in lipid rafts is mandatory for TRAIL-induced apoptosis in B-cell hematologic malignancies*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e863.

-
160. Tanaka, M., et al., *Downregulation of Fas ligand by shedding*. Nat Med, 1998. **4**(1): p. 31-6.
161. Wassenaar, T.A., W.J. Quax, and A.E. Mark, *The conformation of the extracellular binding domain of Death Receptor 5 in the presence and absence of the activating ligand TRAIL: a molecular dynamics study*. Proteins, 2008. **70**(2): p. 333-43.
162. Szegezdi, E., et al., *Kinetics in signal transduction pathways involving promiscuous oligomerizing receptors can be determined by receptor specificity: apoptosis induction by TRAIL*. Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(3): p. M111.013730.
163. Smulski, C.R., et al., *Hetero-oligomerization between the TNF receptor superfamily members CD40, Fas and TRAILR2 modulate CD40 signalling*. Cell Death Dis, 2017. **8**(2): p. e2601.
164. Schulte, M., et al., *ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death*. Cell Death Differ, 2007. **14**(5): p. 1040-9.
165. Mitsiades, N., et al., *Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity*. Cancer Res, 2001. **61**(2): p. 577-81.
166. Knox, P.G., et al., *Inhibition of metalloproteinase cleavage enhances the cytotoxicity of Fas ligand*. J Immunol, 2003. **170**(2): p. 677-85.
167. Secchiero, P., et al., *Metalloproteinase 2 cleaves in vitro recombinant TRAIL: potential implications for the decreased serum levels of TRAIL after acute myocardial infarction*. Atherosclerosis, 2010. **211**(1): p. 333-6.
168. Yan, L., et al., *Metalloprotease inhibitors reducing the shedding of human TRAIL*. Proc. 2011 Int. Conf. Hum. Health Biomed. Eng., 2011. **169**: p. 108-111.
169. Mariani, S.M. and P.H. Krammer, *Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage*. Eur J Immunol, 1998. **28**(3): p. 973-82.
170. Bosque, A., et al., *Comparative proteomics of exosomes secreted by tumoral Jurkat T cells and normal human T cell blasts unravels a potential tumorigenic role for valosin-containing protein*. Oncotarget, 2016. **7**(20): p. 29287-305.
171. Monleon, I., et al., *CD59 cross-linking induces secretion of APO2 ligand in overactivated human T cells*. Eur J Immunol, 2000. **30**(4): p. 1078-87.

172. Wagner, K.W., et al., *Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL*. Nat Med, 2007. **13**(9): p. 1070-7.
173. Wu, Y.H., et al., *Removal of syndecan-1 promotes TRAIL-induced apoptosis in myeloma cells*. J Immunol, 2012. **188**(6): p. 2914-21.
174. Rossin, A., et al., *Palmitoylation of the TRAIL receptor DR4 confers an efficient TRAIL-induced cell death signalling*. Biochem J, 2009. **419**(1): p. 185-92, 2 p following 192.
175. Simons, K. and E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 569-72.
176. Brown, D.A. and E. London, *Functions of lipid rafts in biological membranes*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1998. **14**: p. 111-36.
177. Song, J.H., et al., *Lipid rafts and nonrafts mediate tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand induced apoptotic and nonapoptotic signals in non small cell lung carcinoma cells*. Cancer Res, 2007. **67**(14): p. 6946-55.
178. Ouyang, W., et al., *Redistribution of DR4 and DR5 in lipid rafts accounts for the sensitivity to TRAIL in NSCLC cells*. Int J Oncol, 2011. **39**(6): p. 1577-86.
179. Ouyang, W., et al., *Absence of death receptor translocation into lipid rafts in acquired TRAIL-resistant NSCLC cells*. Int J Oncol, 2013. **42**(2): p. 699-711.
180. Parton, R.G. and A.A. Richards, *Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms*. Traffic, 2003. **4**(11): p. 724-38.
181. Lajoie, P. and I.R. Nabi, *Regulation of raft-dependent endocytosis*. J Cell Mol Med, 2007. **11**(4): p. 644-53.
182. Zhang, Y., T. Yoshida, and B. Zhang, *TRAIL induces endocytosis of its death receptors in MDA-MB-231 breast cancer cells*. Cancer Biol Ther, 2009. **8**(10): p. 917-22.
183. Cano-González, A. and A. López-Rivas, *Opposing roles of TGF- β and EGF in the regulation of TRAIL-induced apoptosis in human breast epithelial cells*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1863**(8): p. 2104-14.
184. Akazawa, Y., et al., *Death receptor 5 internalization is required for lysosomal permeabilization by TRAIL in malignant liver cell lines*. Gastroenterology, 2009. **136**(7): p. 2365-2376.e1-7.

185. Kohlhaas, S.L., et al., *Receptor-mediated endocytosis is not required for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2007. **282**(17): p. 12831-41.
186. Austin, C.D., et al., *Death-receptor activation halts clathrin-dependent endocytosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(27): p. 10283-8.
187. Zhang, Y. and B. Zhang, *TRAIL resistance of breast cancer cells is associated with constitutive endocytosis of death receptors 4 and 5*. Mol Cancer Res, 2008. **6**(12): p. 1861-71.
188. Jin, Z., et al., *Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling*. Cell, 2009. **137**(4): p. 721-35.
189. Feoktistova, M., et al., *cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms*. Mol Cell, 2011. **43**(3): p. 449-63.
190. Kreuz, S., et al., *NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(12): p. 3964-73.
191. Fukazawa, T., et al., *Accelerated degradation of cellular FLIP protein through the ubiquitin-proteasome pathway in p53-mediated apoptosis of human cancer cells*. Oncogene, 2001. **20**(37): p. 5225-31.
192. Pop, C., et al., *FLIP(L) induces caspase 8 activity in the absence of interdomain caspase 8 cleavage and alters substrate specificity*. Biochem J, 2011. **433**(3): p. 447-457.
193. Chang, D.W., et al., *c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis*. Embo j, 2002. **21**(14): p. 3704-14.
194. Micheau, O., et al., *The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex*. J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 45162-71.
195. Boatright, K.M., et al., *Activation of caspases-8 and -10 by FLIP(L)*. Biochem J, 2004. **382**(Pt 2): p. 651-7.
196. Peter, M.E., *The flip side of FLIP*. Biochem J, 2004. **382**(Pt 2): p. e1-3.
197. Oberst, A., et al., *Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis*. Nature, 2011. **471**(7338): p. 363-7.

198. Riley, J.S., et al., *Prognostic and therapeutic relevance of FLIP and procaspase-8 overexpression in non-small cell lung cancer*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e951.
199. Burns, T.F. and W.S. El-Deiry, *Identification of inhibitors of TRAIL-induced death (ITIDs) in the TRAIL-sensitive colon carcinoma cell line SW480 using a genetic approach*. J Biol Chem, 2001. **276**(41): p. 37879-86.
200. Guseva, N.V., et al., *Unique resistance of breast carcinoma cell line T47D to TRAIL but not anti-Fas is linked to p43cFLIP(L)*. Breast Cancer Res Treat, 2008. **107**(3): p. 349-57.
201. Palacios, C., R. Yerbes, and A. Lopez-Rivas, *Flavopiridol induces cellular FLICE-inhibitory protein degradation by the proteasome and promotes TRAIL-induced early signaling and apoptosis in breast tumor cells*. Cancer Res, 2006. **66**(17): p. 8858-69.
202. Yerbes, R., et al., *Cellular FLIP(L) plays a survival role and regulates morphogenesis in breast epithelial cells*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(1): p. 168-78.
203. Yerbes, R., et al., *Control of FLIP(L) expression and TRAIL resistance by the extracellular signal-regulated kinase1/2 pathway in breast epithelial cells*. Cell Death Differ, 2012. **19**(12): p. 1908-16.
204. Ganten, T.M., et al., *Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitisation of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs*. Cell Death Differ, 2004. **11 Suppl 1**: p. S86-96.
205. Geserick, P., et al., *Suppression of cFLIP is sufficient to sensitize human melanoma cells to TRAIL- and CD95L-mediated apoptosis*. Oncogene, 2008. **27**(22): p. 3211-20.
206. Balsas, P., et al., *Cooperation between Apo2L/TRAIL and bortezomib in multiple myeloma apoptosis*. Biochem Pharmacol, 2009. **77**(5): p. 804-12.
207. Fandy, T.E., et al., *Flavopiridol synergizes TRAIL cytotoxicity by downregulation of FLIPL*. Cancer Chemother Pharmacol, 2007. **60**(3): p. 313-9.
208. García-García, C., et al., *AMPK-independent down-regulation of cFLIP and sensitization to TRAIL-induced apoptosis by AMPK activators*. Biochem Pharmacol, 2010. **79**(6): p. 853-63.
209. Martín-Pérez, R., M. Niwa, and A. López-Rivas, *ER stress sensitizes cells to TRAIL through down-regulation of FLIP and Mcl-1 and PERK-dependent up-regulation of TRAIL-R2*. Apoptosis, 2012. **17**(4): p. 349-63.

210. Mauro-Lizcano, M. and A. López-Rivas, *Glutamine metabolism regulates FLIP expression and sensitivity to TRAIL in triple-negative breast cancer cells*. Cell Death Dis, 2018. **9**(2): p. 205.
211. Sánchez-Pérez, T., R.H. Medema, and A. López-Rivas, *Delaying mitotic exit downregulates FLIP expression and strongly sensitizes tumor cells to TRAIL*. Oncogene, 2015. **34**(5): p. 661-9.
212. Sánchez-Pérez, T., G. Ortiz-Ferrón, and A. López-Rivas, *Mitotic arrest and JNK-induced proteasomal degradation of FLIP and Mcl-1 are key events in the sensitization of breast tumor cells to TRAIL by antimicrotubule agents*. Cell Death Differ, 2010. **17**(5): p. 883-94.
213. Clohessy, J.G., et al., *Mcl-1 interacts with truncated Bid and inhibits its induction of cytochrome c release and its role in receptor-mediated apoptosis*. J Biol Chem, 2006. **281**(9): p. 5750-9.
214. Munshi, A., et al., *TRAIL (APO-2L) induces apoptosis in human prostate cancer cells that is inhibitable by Bcl-2*. Oncogene, 2001. **20**(29): p. 3757-65.
215. Hinz, S., et al., *Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis*. Oncogene, 2000. **19**(48): p. 5477-86.
216. LeBlanc, H., et al., *Tumor-cell resistance to death receptor--induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax*. Nat Med, 2002. **8**(3): p. 274-81.
217. Ray, S., O. Bucur, and A. Almasan, *Sensitization of prostate carcinoma cells to Apo2L/TRAIL by a Bcl-2 family protein inhibitor*. Apoptosis, 2005. **10**(6): p. 1411-8.
218. Varfolomeev, E., et al., *Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*. J Biol Chem, 2005. **280**(49): p. 40599-608.
219. Grunert, M., et al., *The adaptor protein FADD and the initiator caspase-8 mediate activation of NF-kappaB by TRAIL*. Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e414.
220. Ehrhardt, H., et al., *TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF-kappaB*. Oncogene, 2003. **22**(25): p. 3842-52.
221. Falschlehner, C., et al., *TRAIL signalling: decisions between life and death*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(7-8): p. 1462-75.

222. Jouan-Lanhouet, S., et al., *TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation*. Cell Death Differ, 2012. **19**(12): p. 2003-14.
223. Ogasawara, J., et al., *Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice*. Nature, 1993. **364**(6440): p. 806-9.
224. Walczak, H., et al., *Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo*. Nat Med, 1999. **5**(2): p. 157-63.
225. Herbst, R.S., et al., *Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(17): p. 2839-46.
226. Herbst, R.S., et al., *A first-in-human study of conatumumab in adult patients with advanced solid tumors*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(23): p. 5883-91.
227. Soria, J.C., et al., *Phase 1b study of dulanermin (recombinant human Apo2L/TRAIL) in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(9): p. 1527-33.
228. Soria, J.C., et al., *Randomized phase II study of dulanermin in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in advanced non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2011. **29**(33): p. 4442-51.
229. Kindler, H.L., et al., *A randomized, placebo-controlled phase 2 study of ganitumab (AMG 479) or conatumumab (AMG 655) in combination with gemcitabine in patients with metastatic pancreatic cancer*. Ann Oncol, 2012. **23**(11): p. 2834-42.
230. Paz-Ares, L., et al., *A randomized phase 2 study of paclitaxel and carboplatin with or without conatumumab for first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer*. J Thorac Oncol, 2013. **8**(3): p. 329-37.
231. Lemke, J., et al., *Getting TRAIL back on track for cancer therapy*. Cell Death Differ, 2014. **21**(9): p. 1350-64.
232. Adams, C., et al., *Structural and functional analysis of the interaction between the agonistic monoclonal antibody Apomab and the proapoptotic receptor DR5*. Cell Death Differ, 2008. **15**(4): p. 751-61.
233. Kelley, S.K., et al., *Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **299**(1): p. 31-8.

-
234. Tolcher, A.W., et al., *Phase I pharmacokinetic and biologic correlative study of mapatumumab, a fully human monoclonal antibody with agonist activity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1*. J Clin Oncol, 2007. **25**(11): p. 1390-5.
235. Chuntharapai, A., et al., *Isotype-dependent inhibition of tumor growth in vivo by monoclonal antibodies to death receptor 4*. J Immunol, 2001. **166**(8): p. 4891-8.
236. Kaplan-Lefko, P.J., et al., *Conatumumab, a fully human agonist antibody to death receptor 5, induces apoptosis via caspase activation in multiple tumor types*. Cancer Biol Ther, 2010. **9**(8): p. 618-31.
237. Wilson, N.S., et al., *An Fcgamma receptor-dependent mechanism drives antibody-mediated target-receptor signaling in cancer cells*. Cancer Cell, 2011. **19**(1): p. 101-13.
238. Haynes, N.M., et al., *CD11c+ dendritic cells and B cells contribute to the tumoricidal activity of anti-DR5 antibody therapy in established tumors*. J Immunol, 2010. **185**(1): p. 532-41.
239. Takeda, K., et al., *TRAIL identifies immature natural killer cells in newborn mice and adult mouse liver*. Blood, 2005. **105**(5): p. 2082-9.
240. Fulda, S., et al., *Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer*. Oncogene, 2001. **20**(41): p. 5865-77.
241. Eggert, A., et al., *Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression*. Cancer Res, 2001. **61**(4): p. 1314-9.
242. Zhang, L., et al., *Mechanisms involved in development of resistance to adenovirus-mediated proapoptotic gene therapy in DLD1 human colon cancer cell line*. Gene Ther, 2002. **9**(18): p. 1262-70.
243. Zhang, L. and B. Fang, *Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer*. Cancer Gene Ther, 2005. **12**(3): p. 228-37.
244. Kim, K., et al., *Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(2): p. 335-46.
245. Ichikawa, K., et al., *Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity*. Nat Med, 2001. **7**(8): p. 954-60.

246. Krueger, A., et al., *FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(24): p. 8247-54.
247. Okano, H., et al., *Cellular FLICE/caspase-8-inhibitory protein as a principal regulator of cell death and survival in human hepatocellular carcinoma*. Lab Invest, 2003. **83**(7): p. 1033-43.
248. Tepper, C.G. and M.F. Seldin, *Modulation of caspase-8 and FLICE-inhibitory protein expression as a potential mechanism of Epstein-Barr virus tumorigenesis in Burkitt's lymphoma*. Blood, 1999. **94**(5): p. 1727-37.
249. Ng, C.P. and B. Bonavida, *X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) blocks Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis of prostate cancer cells in the presence of mitochondrial activation: sensitization by overexpression of second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pI (Smac/DIABLO)*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(12): p. 1051-8.
250. Ng, C.P., A. Zisman, and B. Bonavida, *Synergy is achieved by complementation with Apo2L/TRAIL and actinomycin D in Apo2L/TRAIL-mediated apoptosis of prostate cancer cells: role of XIAP in resistance*. Prostate, 2002. **53**(4): p. 286-99.
251. Pingoud-Meier, C., et al., *Loss of caspase-8 protein expression correlates with unfavorable survival outcome in childhood medulloblastoma*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(17): p. 6401-9.
252. Ruiz-Ruiz, C., C. Muñoz-Pinedo, and A. López-Rivas, *Interferon-gamma treatment elevates caspase-8 expression and sensitizes human breast tumor cells to a death receptor-induced mitochondria-operated apoptotic program*. Cancer Res, 2000. **60**(20): p. 5673-80.
253. Palacios, C., R. Yerbes, and A. López-Rivas, *Flavopiridol induces cellular FLICE-inhibitory protein degradation by the proteasome and promotes TRAIL-induced early signaling and apoptosis in breast tumor cells*. Cancer Res, 2006. **66**(17): p. 8858-69.
254. Rosato, R.R., et al., *Mechanism and functional role of XIAP and Mcl-1 down-regulation in flavopiridol/vorinostat antileukemic interactions*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(2): p. 692-702.
255. Koehler, B.C., et al., *TRAIL-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells is augmented by targeted therapies*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(47): p. 5924-35.
256. Ding, L., et al., *Cisplatin restores TRAIL apoptotic pathway in glioblastoma-derived stem cells through up-regulation of DR5 and down-regulation of c-FLIP*. Cancer Invest, 2011. **29**(8): p. 511-20.

-
257. Pasello, G., et al., *Synergistic antitumor activity of recombinant human Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in combination with carboplatin and pemetrexed in malignant pleural mesothelioma*. J Thorac Oncol, 2014. **9**(7): p. 1008-1017.
258. Nagane, M., et al., *Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vitro and in vivo*. Cancer Res, 2000. **60**(4): p. 847-53.
259. Gibson, S.B., et al., *Increased expression of death receptors 4 and 5 synergizes the apoptosis response to combined treatment with etoposide and TRAIL*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(1): p. 205-12.
260. Wu, X.X., et al., *Enhancement of TRAIL/Apo2L-mediated apoptosis by adriamycin through inducing DR4 and DR5 in renal cell carcinoma cells*. Int J Cancer, 2003. **104**(4): p. 409-17.
261. Wu, G.S., et al., *KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene*. Nat Genet, 1997. **17**(2): p. 141-3.
262. Kim, D.M., et al., *Rapid induction of apoptosis by combination of flavopiridol and tumor necrosis factor (TNF)-alpha or TNF-related apoptosis-inducing ligand in human cancer cell lines*. Cancer Res, 2003. **63**(3): p. 621-6.
263. Lemke, J., et al., *Selective CDK9 inhibition overcomes TRAIL resistance by concomitant suppression of cFlip and Mcl-1*. Cell Death Differ, 2014. **21**(3): p. 491-502.
264. Yaseen, A., et al., *Resveratrol sensitizes acute myelogenous leukemia cells to histone deacetylase inhibitors through reactive oxygen species-mediated activation of the extrinsic apoptotic pathway*. Mol Pharmacol, 2012. **82**(6): p. 1030-41.
265. Sung, E.S., et al., *Histone deacetylase inhibitors synergistically potentiate death receptor 4-mediated apoptotic cell death of human T-cell acute lymphoblastic leukemia cells*. Apoptosis, 2010. **15**(10): p. 1256-69.
266. Nakata, S., et al., *Histone deacetylase inhibitors upregulate death receptor 5/TRAIL-R2 and sensitize apoptosis induced by TRAIL/APO2-L in human malignant tumor cells*. Oncogene, 2004. **23**(37): p. 6261-71.
267. Allen, J.E. and W.S. El-Deiry, *Regulation of the human TRAIL gene*. Cancer Biol Ther, 2012. **13**(12): p. 1143-51.

268. Altucci, L., et al., *Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL*. Nat Med, 2001. **7**(6): p. 680-6.
269. Nebbioso, A., et al., *Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells*. Nat Med, 2005. **11**(1): p. 77-84.
270. Xu, J., J.Y. Zhou, and G.S. Wu, *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand is required for tumor necrosis factor alpha-mediated sensitization of human breast cancer cells to chemotherapy*. Cancer Res, 2006. **66**(20): p. 10092-9.
271. Xu, J., et al., *Evidence that tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induction by 5-Aza-2'-deoxycytidine sensitizes human breast cancer cells to adriamycin*. Cancer Res, 2007. **67**(3): p. 1203-11.
272. Xu, J., et al., *Sp1-mediated TRAIL induction in chemosensitization*. Cancer Res, 2008. **68**(16): p. 6718-26.
273. Allen, J.E., et al., *Dual inactivation of Akt and ERK by TIC10 signals Foxo3a nuclear translocation, TRAIL gene induction, and potent antitumor effects*. Sci Transl Med, 2013. **5**(171): p. 171ra17.
274. Allen, J.E., et al., *Discovery and clinical introduction of first-in-class imipridone ONC201*. Oncotarget, 2016. **7**(45): p. 74380-74392.
275. Prabhu, V.V., et al., *Small-Molecule ONC201/TIC10 Targets Chemotherapy-Resistant Colorectal Cancer Stem-like Cells in an Akt/Foxo3a/TRAIL-Dependent Manner*. Cancer Res, 2015. **75**(7): p. 1423-32.
276. Kline, C.L., et al., *ONC201 kills solid tumor cells by triggering an integrated stress response dependent on ATF4 activation by specific eIF2α kinases*. Sci Signal, 2016. **9**(415): p. ra18.
277. Yuan, X., et al., *Developing TRAIL/TRAIL death receptor-based cancer therapies*. Cancer Metastasis Rev, 2018. **37**(4): p. 733-748.
278. Stein, M.N., et al., *First-in-Human Clinical Trial of Oral ONC201 in Patients with Refractory Solid Tumors*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(15): p. 4163-4169.
279. Wang, S. and W.S. El-Deiry, *TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors*. Oncogene, 2003. **22**(53): p. 8628-33.
280. Trivedi, R. and D.P. Mishra, *Trailing TRAIL Resistance: Novel Targets for TRAIL Sensitization in Cancer Cells*. Front Oncol, 2015. **5**: p. 69.

-
281. Lawrence, D., et al., *Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions*. Nat Med, 2001. **7**(4): p. 383-5.
282. Ashkenazi, A., et al., *Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand*. J Clin Invest, 1999. **104**(2): p. 155-62.
283. Ganten, T.M., et al., *Preclinical differentiation between apparently safe and potentially hepatotoxic applications of TRAIL either alone or in combination with chemotherapeutic drugs*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(8): p. 2640-6.
284. Jo, M., et al., *Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*. Nat Med, 2000. **6**(5): p. 564-7.
285. Schneider, B., et al., *Potent antitumoral activity of TRAIL through generation of tumor-targeted single-chain fusion proteins*. Cell Death Dis, 2010. **1**(8): p. e68.
286. Rozanov, D.V., et al., *Engineering a leucine zipper-TRAIL homotrimer with improved cytotoxicity in tumor cells*. Mol Cancer Ther, 2009. **8**(6): p. 1515-25.
287. de Bruyn, M., E. Bremer, and W. Helfrich, *Antibody-based fusion proteins to target death receptors in cancer*. Cancer Lett, 2013. **332**(2): p. 175-83.
288. Kortt, A.A., et al., *Dimeric and trimeric antibodies: high avidity scFvs for cancer targeting*. Biomol Eng, 2001. **18**(3): p. 95-108.
289. Stieglmaier, J., et al., *Selective induction of apoptosis in leukemic B-lymphoid cells by a CD19-specific TRAIL fusion protein*. Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**(2): p. 233-46.
290. Yan, C., et al., *Human umbilical cord mesenchymal stem cells as vehicles of CD20-specific TRAIL fusion protein delivery: a double-target therapy against non-Hodgkin's lymphoma*. Mol Pharm, 2013. **10**(1): p. 142-51.
291. ten Cate, B., et al., *A novel AML-selective TRAIL fusion protein that is superior to Gemtuzumab Ozogamicin in terms of in vitro selectivity, activity and stability*. Leukemia, 2009. **23**(8): p. 1389-97.
292. El-Mesery, M., et al., *CD40-directed scFv-TRAIL fusion proteins induce CD40-restricted tumor cell death and activate dendritic cells*. Cell Death Dis, 2013. **4**(11): p. e916.
293. Siegemund, M., et al., *Superior antitumoral activity of dimerized targeted single-chain TRAIL fusion proteins under retention of tumor selectivity*. Cell Death Dis, 2012. **3**(4): p. e295.

294. Maeda, H., G.Y. Bharate, and J. Daruwalla, *Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect*. Eur J Pharm Biopharm, 2009. **71**(3): p. 409-19.
295. Fang, J., H. Nakamura, and H. Maeda, *The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(3): p. 136-51.
296. Maeda, H., H. Nakamura, and J. Fang, *The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo*. Adv Drug Deliv Rev, 2013. **65**(1): p. 71-9.
297. Wu, X., et al., *Nanocarriers for TRAIL delivery: driving TRAIL back on track for cancer therapy*. Nanoscale, 2017. **9**(37): p. 13879-13904.
298. Simões, S., et al., *On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times*. Adv Drug Deliv Rev, 2004. **56**(7): p. 947-65.
299. Malam, Y., M. Loizidou, and A.M. Seifalian, *Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer*. Trends Pharmacol Sci, 2009. **30**(11): p. 592-9.
300. Kim, T.H., et al., *PEGylated TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-loaded sustained release PLGA microspheres for enhanced stability and antitumor activity*. J Control Release, 2011. **150**(1): p. 63-9.
301. Kim, T.H., et al., *Preparation and characterization of Apo2L/TNF-related apoptosis-inducing ligand-loaded human serum albumin nanoparticles with improved stability and tumor distribution*. J Pharm Sci, 2011. **100**(2): p. 482-91.
302. Kim, H., et al., *A sulfate polysaccharide/TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) complex for the long-term delivery of TRAIL in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres*. J Pharm Pharmacol, 2013. **65**(1): p. 11-21.
303. De Miguel, D., et al., *Liposomes decorated with Apo2L/TRAIL overcome chemoresistance of human hematologic tumor cells*. Mol Pharm, 2013. **10**(3): p. 893-904.
304. Nair, P.M., et al., *Enhancing the antitumor efficacy of a cell-surface death ligand by covalent membrane display*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(18): p. 5679-84.
305. Loi, M., et al., *sTRAIL coupled to liposomes improves its pharmacokinetic profile and overcomes neuroblastoma tumour resistance in combination with Bortezomib*. J Control Release, 2014. **192**: p. 157-66.

-
306. Mitchell, M.J., et al., *TRAIL-coated leukocytes that kill cancer cells in the circulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(3): p. 930-5.
307. De Miguel, D., et al., *Immunotherapy with liposome-bound TRAIL overcomes partial protection to soluble TRAIL-induced apoptosis offered by down-regulation of Bim in leukemic cells*. Clin Transl Oncol, 2015. **17**(8): p. 657-67.
308. De Miguel, D., et al., *TRAIL-coated lipid-nanoparticles overcome resistance to soluble recombinant TRAIL in non-small cell lung cancer cells*. Nanotechnology, 2016. **27**(18): p. 185101.
309. De Miguel, D., et al., *Improved Anti-Tumor Activity of Novel Highly Bioactive Liposome-Bound TRAIL in Breast Cancer Cells*. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2016. **11**(2): p. 197-214.
310. De Miguel, D., et al., *High-order TRAIL oligomer formation in TRAIL-coated lipid nanoparticles enhances DR5 cross-linking and increases antitumour effect against colon cancer*. Cancer Lett, 2016. **383**(2): p. 250-260.
311. Martinez-Lostao, L., et al., *Liposome-bound APO2L/TRAIL is an effective treatment in a rabbit model of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(8): p. 2272-82.
312. Bitounis, D., et al., *Optimizing Druggability through Liposomal Formulations: New Approaches to an Old Concept*. ISRN Pharm, 2012. **2012**: p. 738432.
313. Urbinati, G., V. Marsaud, and J.M. Renoir, *Anticancer drugs in liposomal nanodevices: a target delivery for a targeted therapy*. Curr Top Med Chem, 2012. **12**(15): p. 1693-712.
314. Allen, T.M. and P.R. Cullis, *Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications*. Adv Drug Deliv Rev, 2013. **65**(1): p. 36-48.
315. Oerlemans, C., et al., *Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release*. Pharm Res, 2010. **27**(12): p. 2569-89.
316. Ranganathan, R., et al., *Nanomedicine: towards development of patient-friendly drug-delivery systems for oncological applications*. Int J Nanomedicine, 2012. **7**: p. 1043-60.
317. Gubernator, J., *Active methods of drug loading into liposomes: recent strategies for stable drug entrapment and increased in vivo activity*. Expert Opin Drug Deliv, 2011. **8**(5): p. 565-80.

318. Kolter, M., et al., *The suitability of liposomes for the delivery of hydrophobic drugs - A case study with curcumin*. Eur J Pharm Biopharm, 2019. **140**: p. 20-28.
319. Barenholz, Y., *Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned*. J Control Release, 2012. **160**(2): p. 117-34.
320. Azanza, J.R., B. Sádada, and J. Reis, *Liposomal formulations of amphotericin B: differences according to the scientific evidence*. Rev Esp Quimioter, 2015. **28**(6): p. 275-81.
321. Abu Lila, A.S. and T. Ishida, *Liposomal Delivery Systems: Design Optimization and Current Applications*. Biol Pharm Bull, 2017. **40**(1): p. 1-10.
322. Kirpotin, D.B., et al., *Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models*. Cancer Res, 2006. **66**(13): p. 6732-40.
323. Park, J.W., C.C. Benz, and F.J. Martin, *Future directions of liposome- and immunoliposome-based cancer therapeutics*. Semin Oncol, 2004. **31**(6 Suppl 13): p. 196-205.
324. Wang, D., et al., *Clinical translation of immunoliposomes for cancer therapy: recent perspectives*. Expert Opin Drug Deliv, 2018. **15**(9): p. 893-903.
325. Zolnik, B.S., et al., *Rapid distribution of liposomal short-chain ceramide in vitro and in vivo*. Drug Metab Dispos, 2008. **36**(8): p. 1709-15.
326. Adiseshaiah, P.P., et al., *Synergistic combination therapy with nanoliposomal C6-ceramide and vinblastine is associated with autophagy dysfunction in hepatocarcinoma and colorectal cancer models*. Cancer Lett, 2013. **337**(2): p. 254-65.
327. Pedrosa, L.R., et al., *Improving intracellular doxorubicin delivery through nanoliposomes equipped with selective tumor cell membrane permeabilizing short-chain sphingolipids*. Pharm Res, 2013. **30**(7): p. 1883-95.
328. Lim, S.C., K.R. Parajuli, and S.I. Han, *The alkyllysophospholipid edelfosine enhances TRAIL-mediated apoptosis in gastric cancer cells through death receptor 5 and the mitochondrial pathway*. Tumour Biol, 2016. **37**(5): p. 6205-16.
329. Lee, A.L., et al., *Synergistic anti-cancer effects via co-delivery of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo2L) and doxorubicin using micellar nanoparticles*. Mol Biosyst, 2011. **7**(5): p. 1512-22.

-
330. Lee, A.L., et al., *Synergistic anticancer effects achieved by co-delivery of TRAIL and paclitaxel using cationic polymeric micelles*. *Macromol Biosci*, 2011. **11**(2): p. 296-307.
331. Guo, L., et al., *TRAIL and doxorubicin combination enhances anti-glioblastoma effect based on passive tumor targeting of liposomes*. *J Control Release*, 2011. **154**(1): p. 93-102.
332. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2018*. 2018. **68**(1): p. 7-30.
333. Jo, V.Y. and C.D. Fletcher, *WHO classification of soft tissue tumours: an update based on the 2013 (4th) edition*. *Pathology*, 2014. **46**(2): p. 95-104.
334. Stojadinovic, A., et al., *Analysis of the prognostic significance of microscopic margins in 2,084 localized primary adult soft tissue sarcomas*. *Ann Surg*, 2002. **235**(3): p. 424-34.
335. *Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. *Ann Oncol*, 2014. **25 Suppl 3**: p. iii113-23.
336. Pappo, A.S. and U. Dirksen, *Rhabdomyosarcoma, Ewing Sarcoma, and Other Round Cell Sarcomas*. *J Clin Oncol*, 2018. **36**(2): p. 168-179.
337. Italiano, A., et al., *Trends in survival for patients with metastatic soft-tissue sarcoma*. *Cancer*, 2011. **117**(5): p. 1049-54.
338. Kager, L., et al., *Primary metastatic osteosarcoma: presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(10): p. 2011-8.
339. Ferrari, A., U. Dirksen, and S. Bielack, *Sarcomas of Soft Tissue and Bone*. *Prog Tumor Res*, 2016. **43**: p. 128-41.
340. Gaspar, N., et al., *Ewing Sarcoma: Current Management and Future Approaches Through Collaboration*. *J Clin Oncol*, 2015. **33**(27): p. 3036-46.
341. Judson, I., et al., *Doxorubicin alone versus intensified doxorubicin plus ifosfamide for first-line treatment of advanced or metastatic soft-tissue sarcoma: a randomised controlled phase 3 trial*. *Lancet Oncol*, 2014. **15**(4): p. 415-23.
342. Samuels, B.L., et al., *Clinical outcomes and safety with trabectedin therapy in patients with advanced soft tissue sarcomas following failure of prior chemotherapy: results of a worldwide expanded access program study*. *Ann Oncol*, 2013. **24**(6): p. 1703-9.

343. Kawai, A., et al., *Systemic Therapy for Soft Tissue Sarcoma: Proposals for the Optimal Use of Pazopanib, Trabectedin, and Eribulin*. Adv Ther, 2017. **34**(7): p. 1556-1571.
344. Martinez-Serra, J., et al., *Yondelis(R) (ET-743, Trabectedin) sensitizes cancer cell lines to CD95-mediated cell death: new molecular insight into the mechanism of action*. Eur J Pharmacol, 2011. **658**(2-3): p. 57-64.
345. Schwartz, G.K., *Trabectedin and the L-Sarcomas: A Decade-Long Odyssey*. J Clin Oncol, 2016. **34**(8): p. 769-71.
346. van der Graaf, W.T., et al., *Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial*. Lancet, 2012. **379**(9829): p. 1879-86.
347. McArthur, G.A., et al., *Molecular and clinical analysis of locally advanced dermatofibrosarcoma protuberans treated with imatinib: Imatinib Target Exploration Consortium Study B2225*. J Clin Oncol, 2005. **23**(4): p. 866-73.
348. Stacchiotti, S., et al., *Sunitinib in advanced alveolar soft part sarcoma: evidence of a direct antitumor effect*. Ann Oncol, 2011. **22**(7): p. 1682-90.
349. Bergantin, E., et al., *Sulforaphane induces apoptosis in rhabdomyosarcoma and restores TRAIL-sensitivity in the aggressive alveolar subtype leading to tumor elimination in mice*. Cancer Biol Ther, 2014. **15**(9): p. 1219-25.
350. Gamie, Z., et al., *TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) for bone sarcoma treatment: Pre-clinical and clinical data*. Cancer Lett, 2017. **409**: p. 66-80.
351. Hotta, T., et al., *Chemotherapeutic agents sensitize sarcoma cell lines to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced caspase-8 activation, apoptosis and loss of mitochondrial membrane potential*. J Orthop Res, 2003. **21**(5): p. 949-57.
352. Wang, S., et al., *TRAIL and doxorubicin combination induces proapoptotic and antiangiogenic effects in soft tissue sarcoma in vivo*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(9): p. 2591-604.
353. Harati, K., et al., *TRAIL and taurolidine enhance the anticancer activity of doxorubicin, trabectedin and mafosfamide in HT1080 human fibrosarcoma cells*. Anticancer Res, 2012. **32**(7): p. 2967-84.
354. Karlisch, C., et al., *Effects of TRAIL and taurolidine on apoptosis and proliferation in human rhabdomyosarcoma, leiomyosarcoma and epithelioid cell sarcoma*. Int J Oncol, 2013. **42**(3): p. 945-56.

-
355. Li, X., et al., *Proteasome inhibitor MG132 enhances TRAIL-induced apoptosis and inhibits invasion of human osteosarcoma OS732 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **439**(2): p. 179-86.
356. Guiho, R., et al., *TRAIL-based therapy in pediatric bone tumors: how to overcome resistance*. Future Oncol, 2015. **11**(3): p. 535-42.
357. Harati, K., et al., *Evaluation of the safety and efficacy of TRAIL and taurolidine use on human fibrosarcoma xenografts in vivo*. Oncol Lett, 2016. **11**(3): p. 1955-1961.
358. Subbiah, V., et al., *Targeting the apoptotic pathway in chondrosarcoma using recombinant human Apo2L/TRAIL (dulanermin), a dual proapoptotic receptor (DR4/DR5) agonist*. Mol Cancer Ther, 2012. **11**(11): p. 2541-6.
359. Camidge, D.R., et al., *A phase I safety and pharmacokinetic study of the death receptor 5 agonistic antibody PRO95780 in patients with advanced malignancies*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(4): p. 1256-63.
360. Plummer, R., et al., *Phase 1 and pharmacokinetic study of lexatumumab in patients with advanced cancers*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(20): p. 6187-94.
361. Taberero, J., et al., *Anticancer activity of the type I insulin-like growth factor receptor antagonist, ganitumab, in combination with the death receptor 5 agonist, conatumumab*. Target Oncol, 2015. **10**(1): p. 65-76.
362. Demetri, G.D., et al., *First-line treatment of metastatic or locally advanced unresectable soft tissue sarcomas with conatumumab in combination with doxorubicin or doxorubicin alone: a phase I/II open-label and double-blind study*. Eur J Cancer, 2012. **48**(4): p. 547-63.
363. Merchant, M.S., et al., *Phase I trial and pharmacokinetic study of lexatumumab in pediatric patients with solid tumors*. J Clin Oncol, 2012. **30**(33): p. 4141-7.
364. Gajate, C. and F. Mollinedo, *Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH(3) (edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells*. Curr Drug Metab, 2002. **3**(5): p. 491-525.
365. Haran, G., et al., *Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1151**(2): p. 201-15.
366. Abraham, S.A., et al., *The liposomal formulation of doxorubicin*. Methods Enzymol, 2005. **391**: p. 71-97.

367. De Miguel, D., *Highly bioactive TRAIL formulations based on lipid nanoparticles*. 2015(Doctoral Thesis).
368. Yang, X., et al., *A novel liposomal formulation of flavopiridol*. Int J Pharm, 2009. **365**(1-2): p. 170-4.
369. Bianchi, M.E., *DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(1): p. 1-5.
370. Tesniere, A., et al., *Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death*. Cell Death Differ, 2008. **15**(1): p. 3-12.
371. Krysko, D.V., et al., *Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(12): p. 860-75.
372. Chaput, N., et al., *Molecular determinants of immunogenic cell death: surface exposure of calreticulin makes the difference*. J Mol Med (Berl), 2007. **85**(10): p. 1069-76.
373. Obeid, M., et al., *Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death*. Nat Med, 2007. **13**(1): p. 54-61.
374. Wemeau, M., et al., *Calreticulin exposure on malignant blasts predicts a cellular anticancer immune response in patients with acute myeloid leukemia*. Cell Death Dis, 2010. **1**: p. e104.
375. Fucikova, J., et al., *Prognostic and Predictive Value of DAMPs and DAMP-Associated Processes in Cancer*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 402.
376. Fucikova, J., et al., *Calreticulin Expression in Human Non-Small Cell Lung Cancers Correlates with Increased Accumulation of Antitumor Immune Cells and Favorable Prognosis*. Cancer Res, 2016. **76**(7): p. 1746-56.
377. Fucikova, J., et al., *Calreticulin exposure by malignant blasts correlates with robust anticancer immunity and improved clinical outcome in AML patients*. Blood, 2016. **128**(26): p. 3113-3124.
378. Cirone, M., et al., *Primary effusion lymphoma cell death induced by bortezomib and AG 490 activates dendritic cells through CD91*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e31732.
379. Garg, A.D., et al., *Trial watch: Immunogenic cell death induction by anticancer chemotherapeutics*. Oncoimmunology, 2017. **6**(12): p. e1386829.
380. Bae, S., et al., *Doxorubicin-loaded human serum albumin nanoparticles surface-modified with TNF-related apoptosis-inducing ligand and*

- transferrin for targeting multiple tumor types*. *Biomaterials*, 2012. **33**(5): p. 1536-46.
381. Bhaumik, S.R., E. Smith, and A. Shilatifard, *Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis*. *Nat Struct Mol Biol*, 2007. **14**(11): p. 1008-16.
 382. Bolden, J.E., M.J. Peart, and R.W. Johnstone, *Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors*. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. **5**(9): p. 769-84.
 383. Chang, J., et al., *Differential response of cancer cells to HDAC inhibitors trichostatin A and depsipeptide*. *Br J Cancer*, 2012. **106**(1): p. 116-25.
 384. McClure, J.J., X. Li, and C.J. Chou, *Advances and Challenges of HDAC Inhibitors in Cancer Therapeutics*. *Adv Cancer Res*, 2018. **138**: p. 183-211.
 385. Schaefer, E.W., et al., *A phase 2 study of vorinostat in acute myeloid leukemia*. *Haematologica*, 2009. **94**(10): p. 1375-82.
 386. Dombret, H., et al., *International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts*. *Blood*, 2015. **126**(3): p. 291-9.
 387. Jazirehi, A.R. and D. Arle, *Epigenetic regulation of the TRAIL/Apo2L apoptotic pathway by histone deacetylase inhibitors: an attractive approach to bypass melanoma immunotherapy resistance*. *Am J Clin Exp Immunol*, 2013. **2**(1): p. 55-74.
 388. Carlisi, D., et al., *The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid sensitises human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by TRAIL-DISC activation*. *Eur J Cancer*, 2009. **45**(13): p. 2425-38.
 389. Lillehammer, T., et al., *Combined treatment with Ad-hTRAIL and DTIC or SAHA is associated with increased mitochondrial-mediated apoptosis in human melanoma cell lines*. *J Gene Med*, 2007. **9**(6): p. 440-51.
 390. Lakshmikanthan, V., et al., *SAHA-sensitized prostate cancer cells to TNFalpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): mechanisms leading to synergistic apoptosis*. *Int J Cancer*, 2006. **119**(1): p. 221-8.
 391. Lauricella, M., et al., *SAHA/TRAIL combination induces detachment and anoikis of MDA-MB231 and MCF-7 breast cancer cells*. *Biochimie*, 2012. **94**(2): p. 287-99.
 392. Iacomino, G., M.C. Medici, and G.L. Russo, *Valproic acid sensitizes K562 erythroleukemia cells to TRAIL/Apo2L-induced apoptosis*. *Anticancer Res*, 2008. **28**(2a): p. 855-64.

393. Pojani, E. and D. Barlocco, *Romidepsin (FK228), An Histone Deacetylase Inhibitor, and its Analogues in Cancer Chemotherapy*. Curr Med Chem, 2020.
394. Smolewski, P. and T. Robak, *The discovery and development of romidepsin for the treatment of T-cell lymphoma*. Expert Opin Drug Discov, 2017. **12**(8): p. 859-873.
395. Sun, W.J., et al., *Romidepsin induces G2/M phase arrest via Erk/cdc25C/cdc2/cyclinB pathway and apoptosis induction through JNK/c-Jun/caspase3 pathway in hepatocellular carcinoma cells*. Biochem Pharmacol, 2017. **127**: p. 90-100.
396. Kinoshita, M., et al., *Evidence of lipid rafts based on the partition and dynamic behavior of sphingomyelins*. Chem Phys Lipids, 2018. **215**: p. 84-95.
397. Schultze, K., et al., *Troglitazone sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis via down-regulation of FLIP and Survivin*. Apoptosis, 2006. **11**(9): p. 1503-12.
398. Roth, W., et al., *The anti-diabetic drug troglitazone sensitizes colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis by down-regulating FLIP*. Verh Dtsch Ges Pathol, 2007. **91**: p. 294-301.
399. Zou, W., et al., *PPARgamma ligands enhance TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation and c-FLIP downregulation in human lung cancer cells*. Cancer Biol Ther, 2007. **6**(1): p. 99-106.
400. Houlihan, W.J., et al., *Phospholipid antitumor agents*. Med Res Rev, 1995. **15**(3): p. 157-223.
401. Mollinedo, F., et al., *ET-18-OCH3 (edelfosine): a selective antitumour lipid targeting apoptosis through intracellular activation of Fas/CD95 death receptor*. Curr Med Chem, 2004. **11**(24): p. 3163-84.
402. Park, Y.S., *Tumor-directed targeting of liposomes*. Biosci Rep, 2002. **22**(2): p. 267-81.
403. De Miguel, D., et al., *Double-Edged Lipid Nanoparticles Combining Liposome-Bound TRAIL and Encapsulated Doxorubicin Showing an Extraordinary Synergistic Pro-Apoptotic Potential*. 2019. **11**(12).
404. Chen, Y., et al., *Potential targets for intervention against doxorubicin-induced cardiotoxicity based on genetic studies: a systematic review of the literature*. J Mol Cell Cardiol, 2020. **138**: p. 88-98.

-
405. Gyöngyösi, M., et al., *Liposomal doxorubicin attenuates cardiotoxicity via induction of interferon-related DNA damage resistance*. Cardiovasc Res, 2020. **116**(5): p. 970-982.
406. Kepp, O., et al., *The immunogenicity of tumor cell death*. Curr Opin Oncol, 2009. **21**(1): p. 71-6.
407. Bloy, N., et al., *Immunogenic stress and death of cancer cells: Contribution of antigenicity vs adjuvanticity to immunosurveillance*. Immunol Rev, 2017. **280**(1): p. 165-174.
408. Kroemer, G., et al., *Immunogenic cell death in cancer therapy*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 51-72.
409. Galluzzi, L., et al., *Immunogenic cell death in cancer and infectious disease*. Nat Rev Immunol, 2017. **17**(2): p. 97-111.
410. Krysko, O., et al., *Many faces of DAMPs in cancer therapy*. Cell Death Dis, 2013. **4**(5): p. e631.
411. Garg, A.D., A.M. Dudek, and P. Agostinis, *Cancer immunogenicity, danger signals, and DAMPs: what, when, and how?* Biofactors, 2013. **39**(4): p. 355-67.
412. Cano-González, A., et al., *Involvement of both caspase-8 and Noxa-activated pathways in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in triple-negative breast tumor cells*. Cell Death Dis, 2018. **9**(2): p. 134.
413. Farooqi, A.A., et al., *Anticancer drugs for the modulation of endoplasmic reticulum stress and oxidative stress*. Tumour Biol, 2015. **36**(8): p. 5743-52.
414. Sullivan, G.P., et al., *TRAIL Receptors Serve as Stress-Associated Molecular Patterns to Promote ER-Stress-Induced Inflammation*. Dev Cell, 2020. **52**(6): p. 714-730.e5.
415. Mahoney, E., et al., *ER stress and autophagy: new discoveries in the mechanism of action and drug resistance of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol*. Blood, 2012. **120**(6): p. 1262-73.
416. Simons, K. and J.L. Sampaio, *Membrane organization and lipid rafts*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(10): p. a004697.
417. Klibanov, A.L., et al., *Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes*. FEBS Lett, 1990. **268**(1): p. 235-7.

- 418. Allen, T.M., et al., *Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1066**(1): p. 29-36.
- 419. Papahadjopoulos, D., et al., *Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(24): p. 11460-4.



Article

Lipid Nanoparticles Decorated with TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Are More Cytotoxic than Soluble Recombinant TRAIL in Sarcoma

Ana Gallego-Lleyda ^{1,2}, Diego De Miguel ^{1,3}, Alberto Anel ^{1,2} and Luis Martinez-Lostao ^{2,4,5,6,*}

¹ Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain; anna89@hotmail.com (A.G.-L.); diego_demiguel@hotmail.com (D.D.M.); anel@unizar.es (A.A.)

² Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón (ISS), 50009 Zaragoza, Spain

³ Cell Death, Cancer and Inflammation, University College of London, London WC1E 6BT, UK

⁴ Servicio de Inmunología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, 50009 Zaragoza, Spain

⁵ Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Universidad de Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

⁶ Instituto de Nanociencia de Aragón, 50009 Zaragoza, Spain

* Correspondence: lumartin@unizar.es; Tel.: +34-976-76-88-59

Received: 15 April 2018; Accepted: 11 May 2018; Published: 13 May 2018



Abstract: Sarcomas are rare and heterogeneous cancers classically associated with a poor outcome. Sarcomas are 1% of the cancer but recent estimations indicate that sarcomas account for 2% of the estimated cancer-related deaths. Traditional treatment with surgery, radiotherapy, and chemotherapy has improved the outcome for some types of sarcomas. However, novel therapeutic strategies to treat sarcomas are necessary. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is a death ligand initially described as capable of inducing apoptosis on tumor cell while sparing normal cells. Only few clinical trials have used TRAIL-based treatments in sarcoma, but they show only low or moderate efficacy of TRAIL. Consequently, novel TRAIL formulations with an improved TRAIL bioactivity are necessary. Our group has developed a novel TRAIL formulation based on tethering this death ligand on a lipid nanoparticle surface (LUV-TRAIL) resembling the physiological secretion of TRAIL as a transmembrane protein inserted into the membrane of exosomes. We have already demonstrated that LUV-TRAIL shows an improved cytotoxic activity when compared to soluble recombinant TRAIL both in hematological malignancies and epithelial-derived cancers. In the present study, we have tested LUV-TRAIL in several human sarcoma tumor cell lines with different sensitivity to soluble recombinant TRAIL, finding that LUV-TRAIL was more efficient than soluble recombinant TRAIL. Moreover, combined treatment of LUV-TRAIL with distinct drugs proved to be especially effective, sensitizing even more resistant cell lines to TRAIL.

Keywords: sarcoma; TRAIL; flavopiridol; immunotherapy; lipid nanoparticles

1. Introduction

Sarcomas include a heterogeneous group of complex cancers which derive from mesenchymal transformed cells. Sarcomas are rare, making up for about 1% of all cancers [1]. It is well known that prognosis of sarcomas is poor, with a 5-year survival rate of less than 15% when metastasis happens [2]. Over the last years, a great effort for improving treatment outcome has been made, but the complexity of sarcomas makes that advancements in developing new therapies are extremely slow [3]. Therefore, there is an urgent need to develop and test novel therapeutic strategies in order to improve prognosis of sarcoma patients [4]. Among the novel anti-tumor agents used, apoptosis ligand 2/TNF-related

apoptosis-inducing ligand (Apo2L/TRAIL) has been tested both in pre-clinical studies and clinical trials in some types of sarcoma [5].

Apoptosis ligand 2/TNF-related apoptosis-inducing ligand (Apo2L/TRAIL) is a TNF family member described as capable of inducing apoptosis in a wide variety of transformed cells while sparing normal cells [6,7]. This fact made TRAIL to be considered as a promising anti-tumor agent. In fact, TRAIL-based therapeutic strategies were developed and used in several phase I/II clinical trials on a wide variety of human cancers [8–10]. However, although TRAIL-based therapies were proven safe, about 50% of human cancers were intrinsically resistant to TRAIL since the clinical studies using TRAIL showed limited therapeutic activity of this death ligand in different types of cancer [9,11,12] including sarcoma [5]. Therefore, novel formulations of TRAIL with improved bioactivity and combination of TRAIL with sensitizing agents could be plausible strategies to overcome TRAIL resistance [13–16].

Our group generated artificial lipid nanoparticles containing membrane-bound TRAIL (LUV-TRAIL), resembling the natural TRAIL-containing exosomes physiologically released by activated human T cells upon re-stimulation [17,18]. We demonstrated that LUV-TRAIL are more effective than soluble recombinant TRAIL (sTRAIL), inducing apoptosis both in vitro and in vivo in hematological malignancies [19–21] as well as in epithelial-derived cancers [22–24].

In the present work, we have tested LUV-TRAIL in several human sarcoma cell lines of distinct origin with different sensitivity to sTRAIL. LUV-TRAIL were more efficient inducing apoptosis in all sarcoma cells tested than sTRAIL. However, although LUV-TRAIL showed a greater pro-apoptotic potential compared to sTRAIL, some sarcoma cell lines still remained fairly resistant to LUV-TRAIL. In this line, a wide range of sensitizing strategies have been described to overcome TRAIL-resistance in tumor cells. Here, we have tested the therapeutic combination of LUV-TRAIL with several drugs previously described as sensitizing agents [23–30], in order to improve the pro-apoptotic ability of LUV-TRAIL. Our results showed that, among all the combinations tested, flavopiridol induced the strongest sensitizing effect in all sarcoma cell lines tested, by inducing a down-regulation of the anti-apoptotic protein FLIP.

In summary, LUV-TRAIL showed an improved cytotoxicity against sarcoma cells, overcoming the intrinsic resistance of these cells to sTRAIL. This was further potentiated when they were combined with sensitizing agents such as flavopiridol (FVP), opening the door to future clinical applications as anti-tumor therapy in sarcoma.

2. Results

2.1. LUV-TRAIL Showed an Enhanced In Vitro Cytotoxic Activity Compared to Soluble Recombinant TRAIL in Human Sarcoma Cells

First, dose-response assays were carried out to compare the in vitro bioactivity of sTRAIL and LUV-TRAIL, and cell viability was analyzed by the MTT assay (Figure 1a). Whereas A673 cells showed a great sensitivity both to sTRAIL and LUV-TRAIL, HT-1080 and RD cell lines showed a moderate sensitivity to sTRAIL. However, LUV-TRAIL was capable of inducing a significant decrease of cell viability both in HT-1080 and RD cells in comparison with sTRAIL. To assess whether the decrease in cell viability observed after treatment with both forms of TRAIL (sTRAIL and LUV-TRAIL) was due to the onset of cell death, annexin-V staining was performed (Figure 1b). In all sarcoma cell lines tested, LUV-TRAIL induced a remarkable increase of cell death at higher dose used (1000 ng/mL) when compared to sTRAIL. Importantly, the cell death observed in all sarcoma cell lines was specifically attributable to TRAIL-receptor activation by TRAIL, as cell death was completely inhibited when cells were pre-incubated with the TRAIL neutralizing antibody RIK2 before treatment with sTRAIL and LUV-TRAIL (Figure 1b). In this line, LUVs alone (without TRAIL anchoring on their surface), did not exert any cytotoxic effect in any sarcoma cell lines tested (see black bars on control points in Figure 1b).

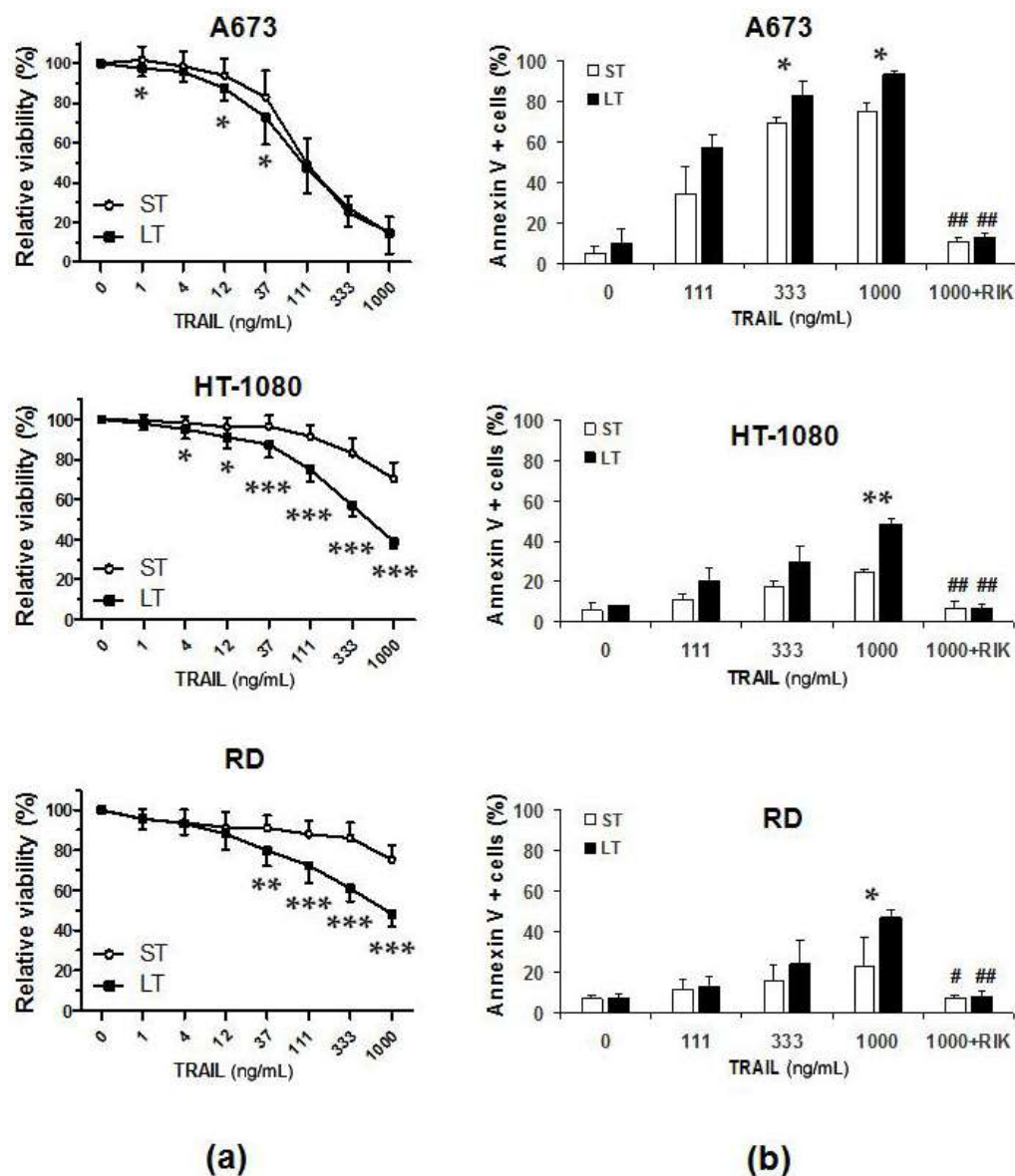


Figure 1. (a) Analysis of cell viability after treatment with LUV-TRAIL on human sarcoma cell lines. Dose-response assays using the indicated doses of sTRAIL (ST) and LUV-TRAIL (LT) were performed on A673 cells, HT-1080 cells, and RD cells. Cells were treated with ST or LT for 24 h. Then, cell viability was measured by the MTT assay method. Graphs show the mean \pm SD of at least three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; (b) Cytotoxicity assays on human sarcoma cell lines. Cells were treated with indicated doses of sTRAIL (ST) or LUV-TRAIL (LT) for 24 h and annexin V positive cells were quantified by flow cytometry. When cells were treated with 1000 ng/mL, they were previously pre-incubated in presence or absence of the anti-TRAIL blocking mAb, RIK2 (500 ng/mL). Graphics show the percentage of annexin-V positive cells analyzed expressed as the mean \pm SD of at least three experiments. * $p < 0.05$. (ST versus LT). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ (ST versus ST + RIK2 and, LT versus LT + RIK2). TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand; LUV-TRAIL, TRAIL on a lipid nanoparticle surface; sTRAIL, soluble recombinant TRAIL.

2.2. LUV-TRAIL Activated the Caspase Cascade More Efficiently than sTRAIL in Human Sarcoma Cells

Next, the implication of caspases in the cytotoxicity induced by LUV-TRAIL in sarcoma cells was assessed. For that purpose, sarcoma cells were incubated with sTRAIL or LUV-TRAIL and activation of the main caspases involved in the extrinsic apoptotic pathway was analyzed by Western blot. Activation of both caspase-8 and caspase-3 was clearly increased when sarcoma cells were treated with LUV-TRAIL compared to sTRAIL, as evidenced by the disappearance of the pro-forms of both caspases (Figure 2a). Moreover, cleavage of the specific caspase-3 substrate, PARP-1, and the specific caspase-8 substrate, Bid, correlated with the activation of both caspases -3 and -8, respectively, indicating a fully functional activation of the extrinsic apoptotic pathway upon LUV-TRAIL treatment. When time course assays were performed (Figure 2b), caspase activation was faster in A673 cells when they were treated with LUV-TRAIL, although, as seen previously, both formulations of TRAIL present similar cytotoxicity at 24 h. In HT-1080 cells, similar kinetics was observed at shorter times when they were treated both with sTRAIL and LUV-TRAIL. However, as shown in Figure 2a, caspase activation was greater when HT-1080 cells were treated with LUV-TRAIL in comparison with sTRAIL after 24 h of treatment. These data reflect that LUV-TRAIL required longer time of incubation to induce a greater caspase activation and, hence, a greater cytotoxicity than sTRAIL in HT-1080 cells. In case of RD cells, although no obvious differences could be observed in caspase activation after treatment with sTRAIL or LUV-TRAIL, Bid and PARP-1 degradation was faster when cells were treated with LUV-TRAIL. Finally, to fully assess and characterize the role of caspases in LUV-TRAIL induced cell death, cell death-inhibition assays were performed using the general caspase inhibitor z-VAD-fmk (Figure 2c). As expected, caspase inhibition fully abrogated cell death induced not only by sTRAIL but also by LUV-TRAIL. Moreover, when cells were pre-incubated with the specific caspase-8 inhibitor IETD-fmk, cell death induced by LUV-TRAIL was also fully abrogated, proving that cell death was fully dependent on the activation of the canonical extrinsic apoptotic pathway, ruling out any other form of cell death that could be triggered by TRAIL, such as necroptosis.

2.3. Combination of LUV-TRAIL with Anti-Cancer Agents Improved its Cytotoxicity against Human Sarcoma Cells

Although LUV-TRAIL showed a greater cytotoxic effect than sTRAIL and was able to overcome sTRAIL resistance in HT-1080 and RD cells, LUV-TRAIL was only capable of inducing a decrease of cell viability of around 50% in both sarcoma cell lines at the 1000 ng/mL dose. Therefore, we decided to combine LUV-TRAIL with several anti-cancer agents such as flavopiridol (FVP), doxorubicin (DOX), trabectedin (TRAB), and bortezomib (BORT) in order to improve LUV-TRAIL-induced cytotoxicity. First of all, dose-response assays were carried out to analyze the cytotoxic effect of all anti-cancer agents used alone (Figure 3). Aiming for a sensitizing effect rather than an additive effect, sub-toxic doses of the different drugs were selected by choosing the maximum concentrations not inducing a decrease of cell viability greater than 20% (marker doses for each anti-cancer drug in Figure 3).

After that, dose-response assays were carried out by pre-incubating sarcoma cells with the selected doses of each anti-cancer drug for 2 h before treating with either sTRAIL or LUV-TRAIL.

In the case of A673 cells, although both sTRAIL and LUV-TRAIL induced a great decrease of cell viability at the highest dose used (1000 ng/mL), all different anti-cancer drugs were able to sensitize to LUV-TRAIL at intermediate doses (Figure 4a).

In HT-1080 cells, although FVP greatly sensitized to both sTRAIL and LUV-TRAIL, the combination with LUV-TRAIL was the most cytotoxic (Figure 4b). Combination of TRAIL with DOX sensitized to both sTRAIL and LUV-TRAIL to the same extent. Similarly, BORT equally sensitized the cells to both sTRAIL and LUV-TRAIL, whereas TRAB did not show any sensitizing effect whatsoever (Figure 4b).

Finally, in RD cells, combination of both sTRAIL and LUV-TRAIL with FVP or TRAB induced similar cytotoxicity levels, whereas DOX and BORT did not sensitize to neither sTRAIL nor LUV-TRAIL (Figure 4c).

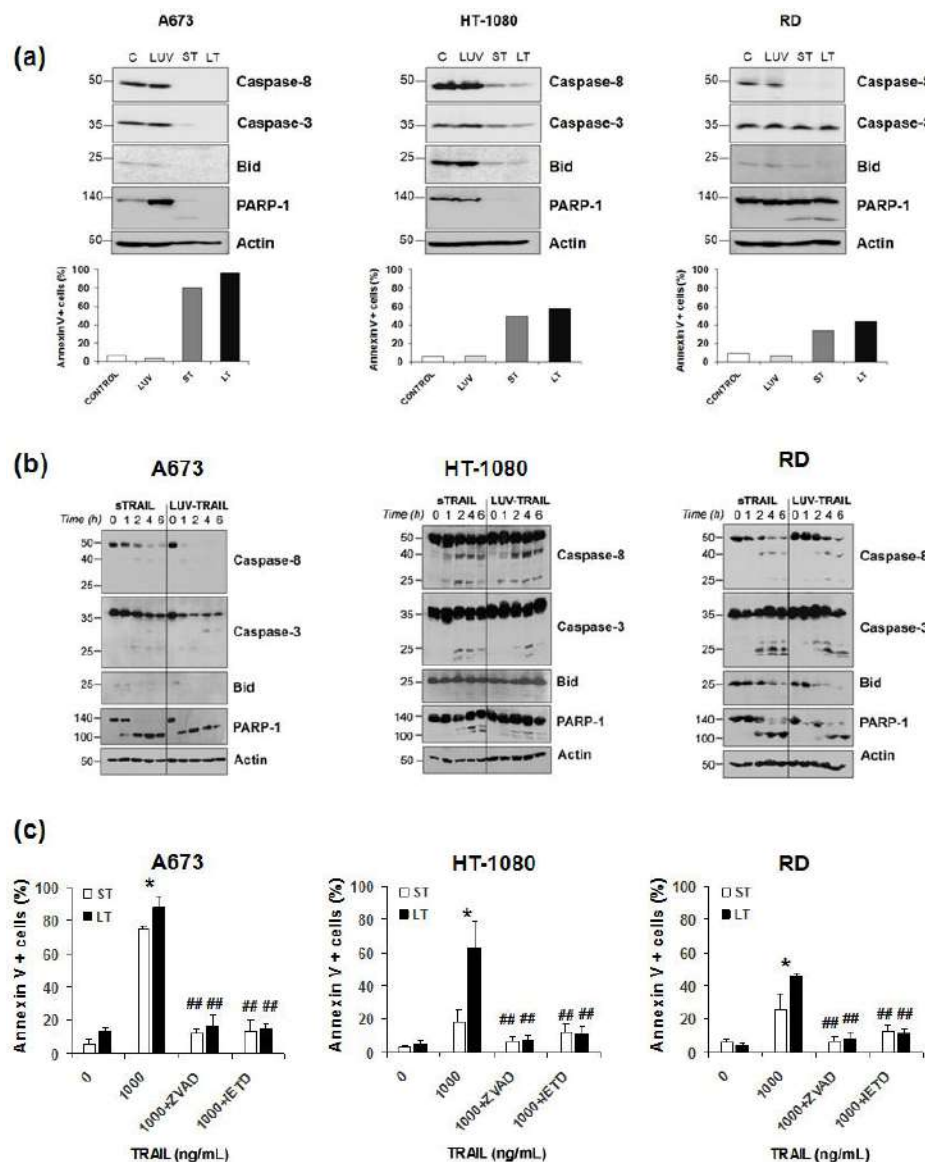


Figure 2. (a) Analysis of caspase activation in human sarcoma cells. Cells were untreated (Control, designed as C), or treated with LUVs without TRAIL (LUV), sTRAIL (ST), and LUV-TRAIL (LT) at 1000 ng/mL for 24 h. After that, cells were lysed, and lysates were subjected to SDS-PAGE and to Western blot analysis. Levels of caspase-8, caspase-3, Bid, and PARP-1 were analyzed using specific antibodies. Level of actin levels was used as a control for equal protein loading. Cell death was measured in parallel by flow cytometry after annexin-V staining (bottom graphs); (b) Analysis of time-course caspase activation in human sarcoma cells. Cells were treated with sTRAIL or LUV-TRAIL at 1000 ng/mL at the indicated times. After that, cells were lysed, and lysates were subjected to SDS-PAGE and to Western blot analysis. Levels of caspase-8, caspase-3, Bid, and PARP-1 were analyzed using specific antibodies. Level of actin levels was used as a control for equal protein loading. Caspase activation was evidenced by the disappearance of the pro-forms shown in the Western blot; (c) Analysis of cell death inhibition by caspase inhibition. Human sarcoma cells were treated with 1000 ng/mL of both sTRAIL (ST) and LUV-TRAIL (LT) for 24 h previously incubated in presence or absence of the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk (30 μ M) and of the specific caspase-8 inhibitor IETD-fmk (30 μ M). Graphics show the mean \pm SD of the cell death of treated cells expressed as percentage of at least three experiments. * $p < 0.05$. (ST versus LT). ## $p < 0.01$ (ST versus ST + caspase inhibitors and, LT versus LT + caspase inhibitors).

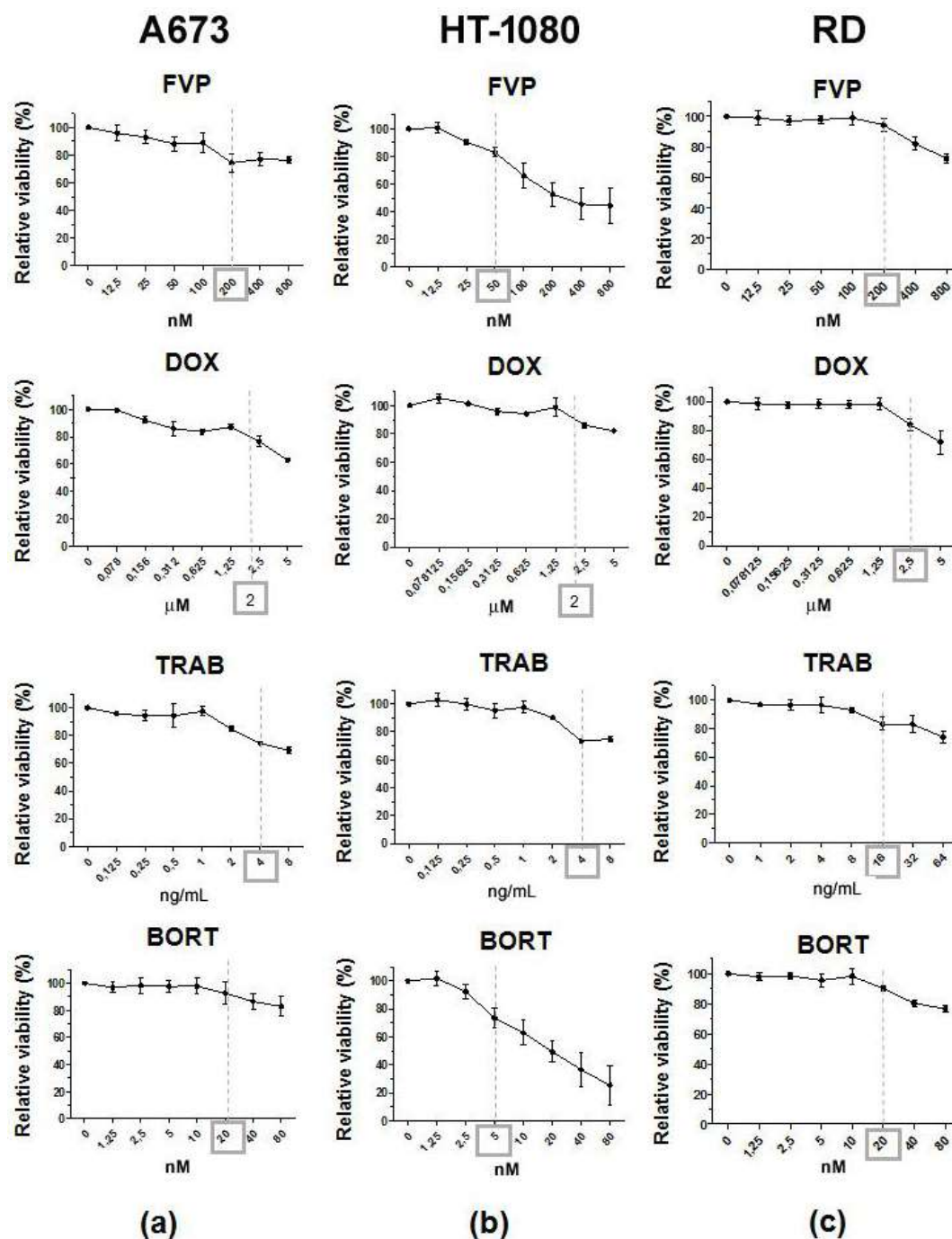


Figure 3. Analysis of the effect of sensitizer agents in cell viability of human sarcoma cells. Dose-response assays using the sensitizer agents: flavopiridol (FVP), doxorubicin (DOX), trabectedin (TRAB), and bortezomib (BORT) were performed on A673 cells (a), HT-1080 cells (b), and RD cells (c). Cell viability was assessed by MTT assay after 24 h. The results were expressed as the mean \pm SD of at least three experiments. Marked doses of each drugs were selected for further experiments of sensitization.

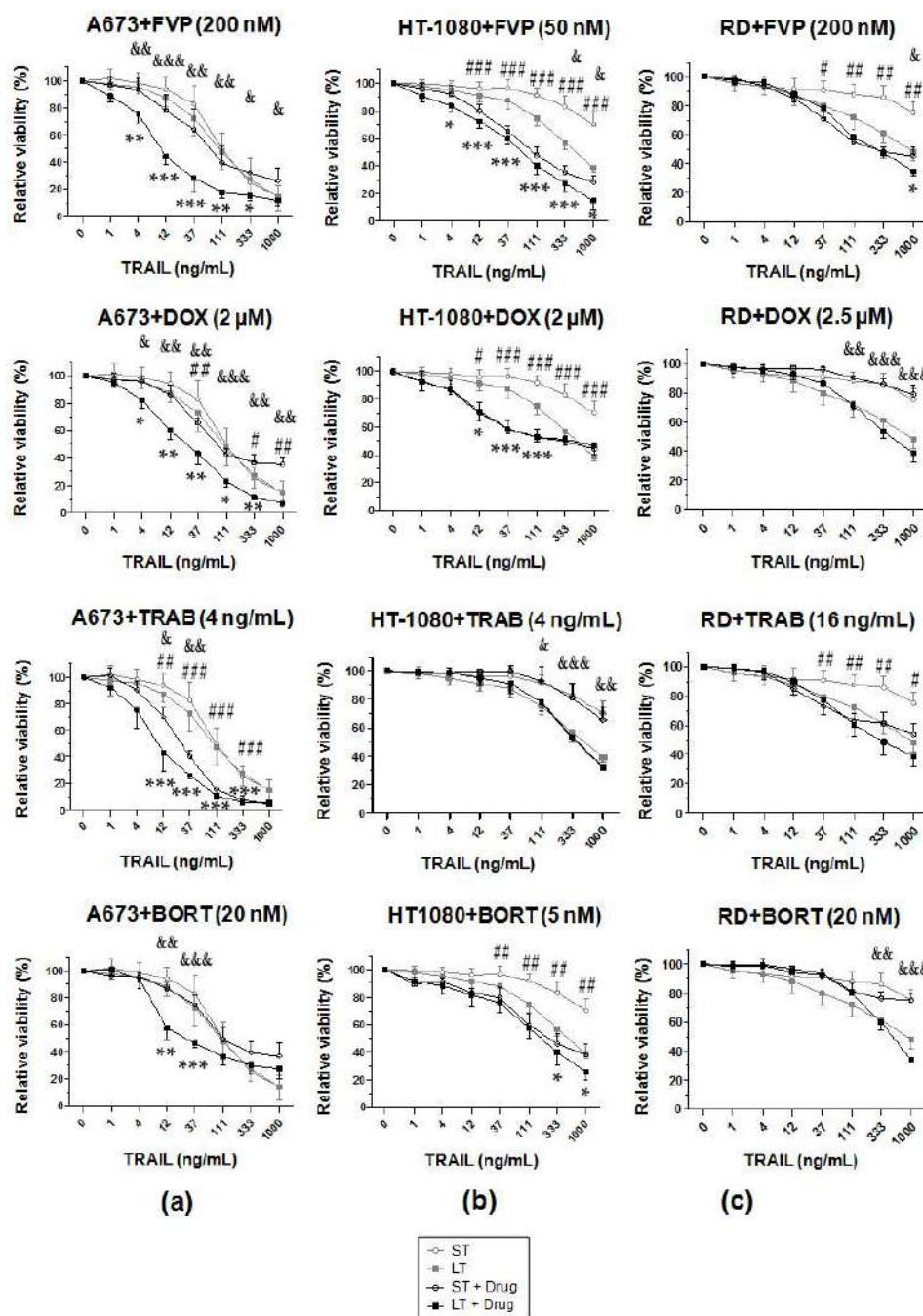


Figure 4. Analysis of cell viability of human sarcoma cell lines after treatment with sTRAIL or LUV-TRAIL in combination with sensitizer agents. Cells were pre-incubated for 2 h with sensitizer drugs: flavopiridol (FVP), doxorubicin (DOX), trabectedin (TRAB), and bortezomib (BORT) at indicated doses. Afterwards, sTRAIL (ST) or LUV-TRAIL (LT) were added at the indicated concentrations and left overnight. The following day, cell viability was measured by the MTT assay. In every graph, the results from treatments with ST and LT in the absence of drugs are superposed in light grey to show the sensitizing effect more clearly. Graphs show the mean \pm SD of at least independent experiments. Asterisk signs indicate significance between LT alone with LT in combination with a given drug (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$). Pound signs indicate significance between ST alone with ST in combination with a given drug (# $p < 0.05$, ## $p < 0.005$, ### $p < 0.001$). Ampersand signs indicate significance between ST in combination with a given drug with LT in combination with same drug. (& $p < 0.05$, && $p < 0.005$, &&& $p < 0.001$).

2.4. Combination of FVP with LUV-TRAIL Induced Apoptotic Cell Death and Decreased Long-Term Clonogenic Survival of Human Sarcoma Cells

According to the results obtained, combination of LUV-TRAIL with FVP greatly enhanced their cytotoxic ability in all sarcoma cell lines tested. Next, we sought to confirm whether the decrease of cell viability observed in Figure 4 was due to the induction of apoptosis or to a cytostatic effect. First, appearance of typical apoptotic features was assessed by microscopy (Figure 5a). In all cases, cells treated with sTRAIL and LUV-TRAIL alone or in combination with FVP exhibited the typical apoptotic nuclear morphological changes such as blebbing, nuclear fragmentation, and chromatin condensation (Figure 5a). Moreover, these nuclear apoptotic morphological changes were more pronounced when both forms of TRAIL were combined with FVP compared with treatments with TRAIL alone (both sTRAIL and LUV-TRAIL). Finally, apoptotic morphological changes correlated in all cases with induction of apoptosis carried out in parallel using annexin V staining (Figure 5a, showed as percentage of annexin V positive cells below each picture).

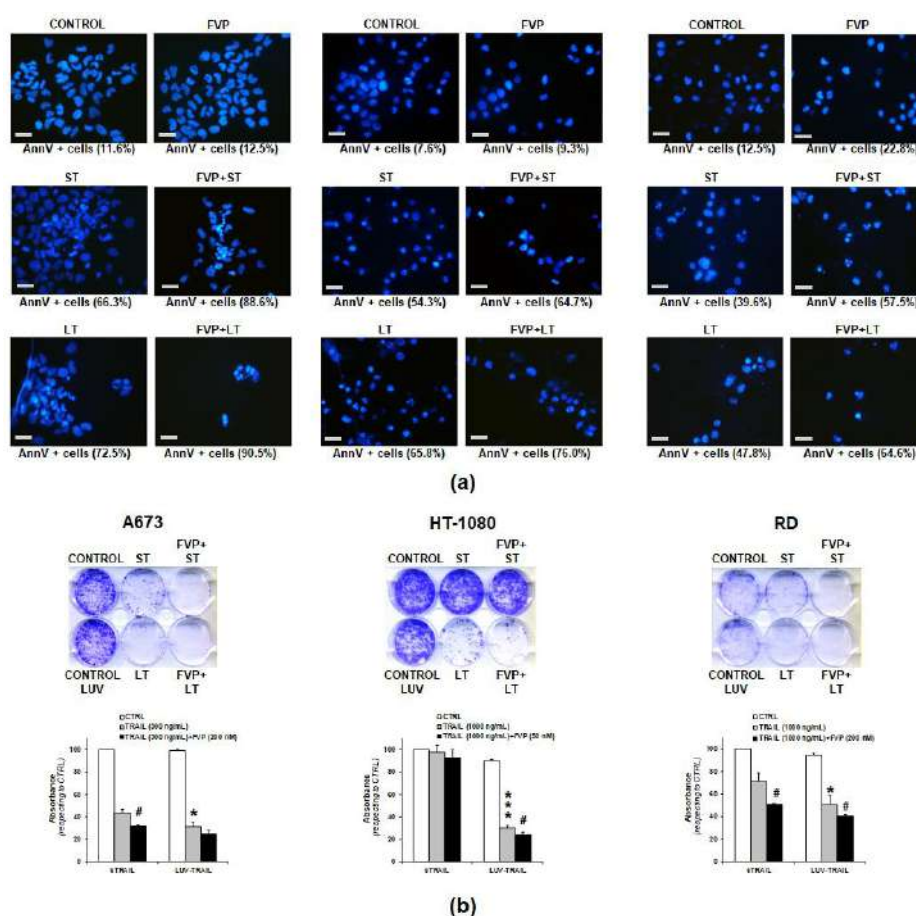


Figure 5. (a) Analysis of nuclear morphological changes after combination of LUV-TRAIL with FVP. Human sarcoma cells were pre-incubated for 1 h with flavopiridol (FVP, 200 nM for A673 and RD cells, 50 nM for HT-1080 cells). Afterwards, sTRAIL (ST) or LUV-TRAIL (LT) were added (300 ng/mL for A673 cells and 1000 ng/mL for HT-1080 and RD cells) and left overnight. The following day, nuclear staining was performing by using Hoechst 33342. As control, cells were untreated (CONTROL) or treated only with FVP (FVP) at above indicated doses. Original magnification at 400 \times . Scale bar = 20 μ M.

Cell death was measured in parallel by flow cytometry after annexin-V staining (bottom graphs); (b) Analysis of clonogenic survival after combination of LUV-TRAIL with FVP. Clonogenic assay was performed to analyze long-term survival in human sarcoma cells after treatment with sTRAIL (ST) or LUV-TRAIL (LT) for 24 h (300 ng/mL for A673 cells and 1000 ng/mL for HT-1080 and RD cells). As indicated, cells were pre-incubated with FVP (FVP, 200 nM for A673 and RD cells, 50 nM for HT-1080 cells) for 1 h. Upper panels show 6-well plates seeded with human sarcoma cells and stained with crystal violet after 11 days. Bottom panels show the quantification of crystal violet absorbance after solubilizing in DMSO and measuring absorbance at 550 nm. Graphic shows the mean \pm SD of the absorbance of treated cells expressed as percentage with respect to the untreated cells (control). Asterisk signs indicate significance between LT and LT (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$). Pound signs indicate significance between TRAIL (ST or LT) alone with TRAIL in combination with FVP (# $p < 0.05$).

Next, we sought to analyze the long-term cytotoxic effect of the combinations of both forms of TRAIL alone or in combination with FVP. For this purpose, clonogenic assays were carried out. (Figure 5b). Notably, liposomes alone (without TRAIL anchored on their surface) were added as controls to rule out any long-term cytotoxic effect of the lipid nanoparticles (see controls for LUV-TRAIL in Figure 5b). Treatment with LUV-TRAIL for 24 h significantly delayed clonogenic survival of sarcoma cells when compared to sTRAIL, indicating that LUV-TRAIL not only showed a greater cytotoxic short-term effect than sTRAIL but also showed a long-term effect affecting to survival and proliferation of sarcoma cells. Remarkably, when both forms of TRAIL were combined with FVP, the clonogenic survival of sarcoma cells was enhanced compared to TRAIL alone, being again more pronounced in the case of LUV-TRAIL.

2.5. Combination of FVP with LUV-TRAIL Activated the Caspase Cascade More Efficiently than with sTRAIL in Human Sarcoma Cells

After assessing the greater cytotoxic effect of the combination of LUV-TRAIL with FVP at both short and long term, activation of the main caspases involved in the extrinsic apoptotic pathway (caspase-8 and caspase-3) was analyzed by Western blot. As aforementioned (Figure 2), both sTRAIL and LUV-TRAIL induced the activation of the extrinsic apoptotic pathway, as shown by the clear decrease of the pro-forms of both caspases-8 and -3, as well as of Bid and PARP-1, in the three sarcoma cell lines tested (Figure 6a). Moreover, caspase activation correlated in all cases with induction of apoptosis as indicated by annexin V staining performed in parallel (Figure 6a, lower panels). Pretreatment with FVP greatly increased the disappearance of all proteins, proving that FVP sensitization to both sTRAIL and LUV-TRAIL relies on an enhanced activation of the extrinsic apoptotic pathway. Importantly, FVP did not induce any detectable caspase activation in any sarcoma cell tested (Figure 6a, lower panels).

On the other hand, cell death induced by combination of either sTRAIL or LUV-TRAIL with FVP was fully inhibited by the general caspase inhibitor z-VAD-fmk and the specific caspase inhibitor IETD-fmk. These data demonstrated that cell death induced by the combination of FVP with TRAIL (sTRAIL and LUV-TRAIL) was a caspase-dependent apoptotic process through the activation of the extrinsic apoptotic pathway by caspase-8 (Figure 6b). In this line, cell death induced by the combination of FVP with both formulations of TRAIL was exclusively dependent of TRAIL since blocking TRAIL-signaling with the TRAIL-blocking antibody RIK2 entirely abrogated apoptosis induced by combination of FVP with both sTRAIL and LUV-TRAIL (Figure 6b).

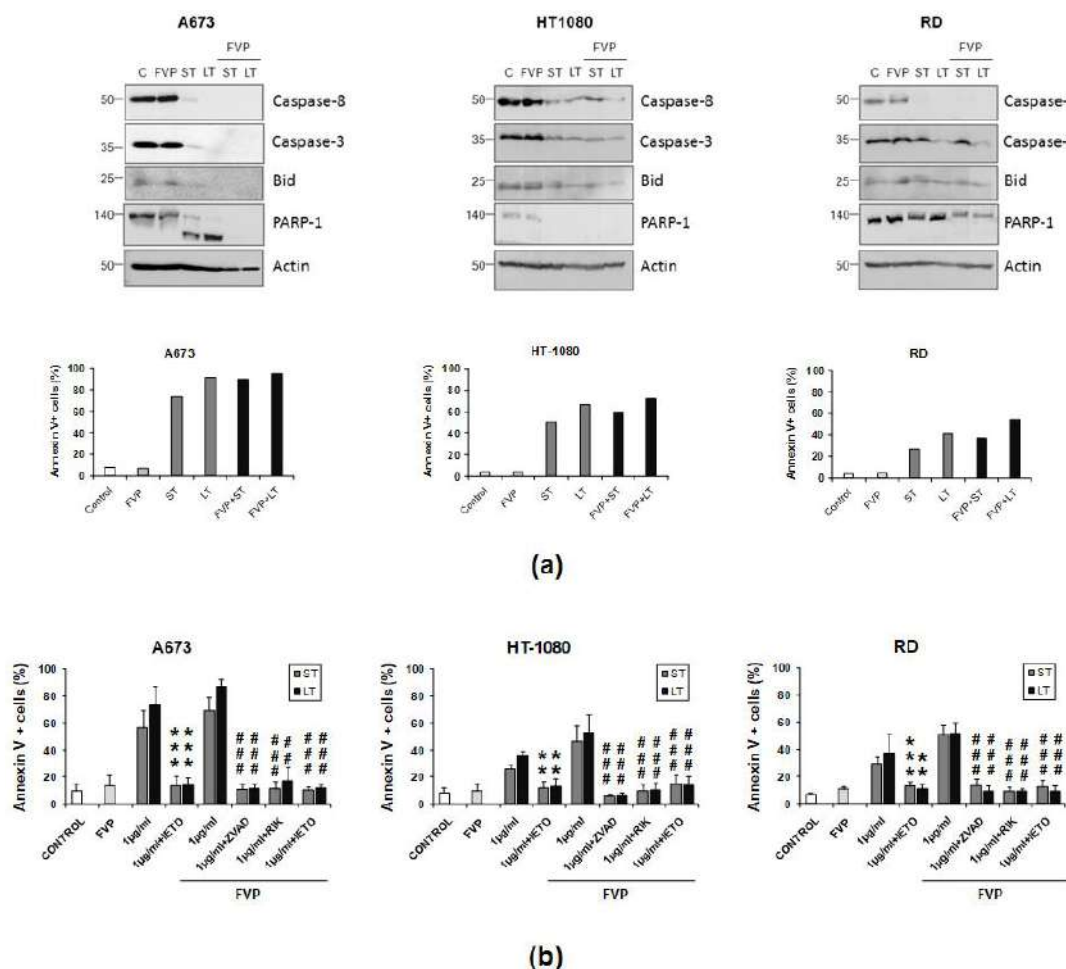


Figure 6. (a) Caspase activation induced by combined treatments in human breast tumor cells. Cells were pre-incubated for 1 h with FVP (200 nM for A673 and RD cells, 50 nM for HT-1080 cells) and then treated with indicated doses of sTRAIL (ST) or LUV-TRAIL (LT) overnight. After that, cells were lysed and levels of caspase-8, caspase-3, Bid, and PARP-1 were analyzed by Western blot analysis using specific antibodies. Actin levels were also determined as a control for equal protein loading (upper panels). As control, cells were untreated (C) or treated only with FVP at above indicated doses. An aliquot of untreated and treated human sarcoma cells was collected in parallel and apoptosis was analyzed by annexin V staining using flow cytometry (lower panels); (b) Analysis of apoptosis inhibition by caspase inhibition. Human sarcoma cells were treated with indicated doses of sTRAIL (ST) and LUV-TRAIL (LT) previously pre-incubated in presence or absence of FVP (200 nM for A673 and RD cells, 50 nM for HT-1080 cells). Combined treatment was also performed pre-incubating with the TRAIL-blocking antibody RIK2 (500 ng/mL), with the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk (30 μ M) and with the specific caspase-8 inhibitor IETD-fmk (30 μ M). Graphics show the percentage of annexin-V positive cells analyzed by flow cytometry as the mean \pm SD of at least three experiments. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (ST versus ST + RIK and, LT versus LT + RIK). ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ (ST versus ST + caspase inhibitors and, LT versus LT + caspase inhibitors).

2.6. FVP Diminished Expression of Anti-Apoptotic Proteins in Human Sarcoma Cells

After assessing the enhanced cytotoxic activity showed by combined treatments of both TRAIL formulations with FVP, we analyzed the underlying mechanism of FVP-induced sensitization to TRAIL. Analysis of FVP effect on the surface expression of pro-apoptotic receptors, DR4 and DR5, and decoy receptors, DcR1 and DcR2, showed no significant changes of death receptors (DR) upon treatment with FVP (Figure 7a).

Therefore, we investigated the expression of different proteins involved in the regulation of TRAIL-induced apoptosis in sarcoma cells by Western blot. As previously observed, we confirmed that FVP did not significantly induce apoptosis at the doses used (Figure 7b, bottom panels). Flavopiridol induced a clear decrease of the anti-apoptotic protein FLIP (mainly cFLIP_s) in all sarcoma cell lines tested (Figure 7b, upper panels). Moreover, in A673 cells a clear decrease of the anti-apoptotic protein XIAP was observed. Finally, expression of other anti-apoptotic proteins such as Mcl-1 and Bcl-X_L did not vary after FVP treatment in any sarcoma cell line tested (Figure 7b).

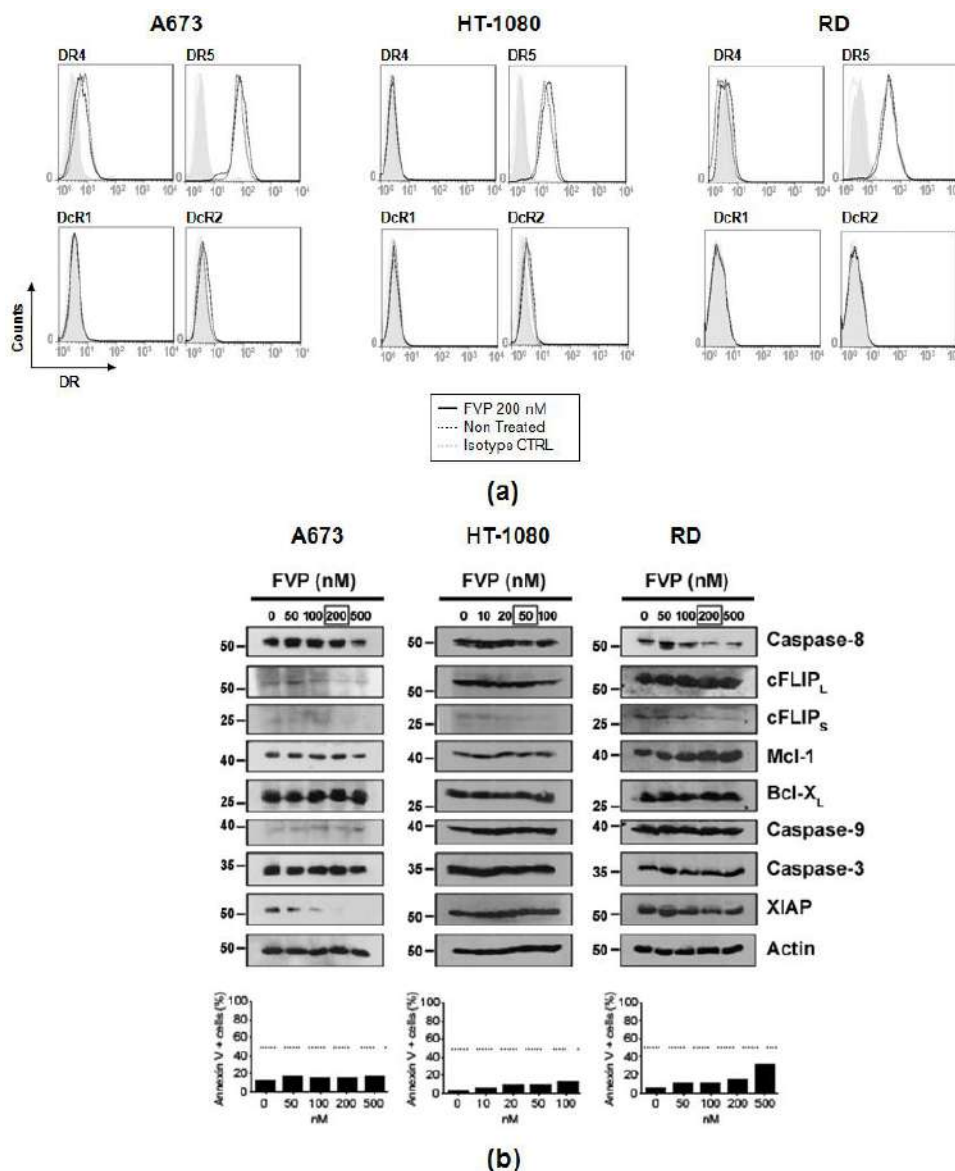


Figure 7. (a) Effect of FVP in death receptor (DR) surface expression in human sarcoma cells. Surface expression of DR4, DR5, DcR1, and DcR2 in A673, HT-1080, and RD cells untreated (black dotted line) or treated with 200 nM FVP for 16 h (black line) was analyzed by flow cytometry. Grey dotted line indicates isotype control and grey histogram indicates unlabeled cells. (b) Effect of FVP in protein expression in human sarcoma cells. Flavopiridol (FVP) were used at indicated doses was used to treat human sarcoma cell lines for 16 h. After that, cells 10⁶ cells were lysed and expression of caspase-8, FLIP, Mcl-1, Bcl-X_L, caspase-9, caspase-3, and XIAP were analyzed by Western blot using specific antibodies. Actin levels were also determined as a control for equal protein loading (upper panels). An aliquot of untreated and treated human sarcoma cells was collected in parallel and labeled with annexin-V. Apoptosis was analyzed by flow cytometry (lower panels).

3. Discussion

Sarcomas are relatively rare malignant tumors of mesenchymal origin and constitute about 1% of all cancers. Current treatment of sarcomas implies a multidisciplinary approach including surgery, chemotherapy, and radiotherapy [31]. This has led to an improvement in prognosis of patients with sarcoma (overall survival about 50%) [32]. However, the implementation of novel therapies could help to improve the survival of patients suffering from sarcoma in the future. In this line, TRAIL has been tested in distinct types of sarcoma both in pre-clinical studies and clinical trials [5]. However, the potential of TRAIL as possible treatment in sarcomas has been explored in all cases using the soluble form of TRAIL [28,33,34].

Our group previously generated a new TRAIL formulation (LUV-TRAIL) based on tethering human recombinant TRAIL on the surface of artificial LUV-type liposomes. The improved bioactivity of LUV-TRAIL has been validated in a broad panel of human cancer cells derived from hematological malignancies [19–21], as well as epithelial cancer cells both in vitro and in vivo [22–24]. Notably, although LUV-TRAIL was more cytotoxic than sTRAIL against cancer cells, it lacked toxicity against normal cells both in vitro [19] and in vivo [23]. The enhanced bioactivity of LUV-TRAIL compared with sTRAIL relied on its capability of forming supra-trimeric populations of high molecular order which were not present in sTRAIL [24]. These supra-trimeric populations of high molecular order present in LUV-TRAIL formulation promoted the clear formation of DR5 oligomers on the target cells. In short, liposome-bound TRAIL induced superior DR5 clustering, enhancing DISC recruitment and, consequently, triggering caspase activation more efficiently than the sTRAIL [20,24].

In the present work, we have extended the study of the anti-tumor potential of LUV-TRAIL to sarcomas. LUV-TRAIL was capable of inducing cell death more efficiently than sTRAIL both in TRAIL-sensitive sarcoma cells (A673) cells and TRAIL-resistant sarcoma cells (HT-1080 and RD). Cell death induced by LUV-TRAIL in sarcoma cells was specifically due to TRAIL since pre-incubation with the neutralizing antibody RIK2 before treatment fully abrogated cell death induced by LUV-TRAIL. In this line, LUVs without TRAIL anchoring on their surface did not show any cytotoxicity in sarcoma cells, confirming that LUV-TRAIL-induced cell death was in fact fully attributable to TRAIL. Moreover, cell death induced by LUV-TRAIL was a caspase-dependent apoptotic process through the activation of the extrinsic apoptotic pathway by caspase-8 as evidenced by the fact that the pan-caspase inhibitor zVAD-fmk and the specific caspase-8 inhibitor IETD-fmk completely inhibited LUV-TRAIL-induced cell death.

It is interesting that in the several studies that have explored the anti-tumor potential of TRAIL in sarcomas, this death ligand has been used in combination with other drugs, indicating that some sarcoma types are partially resistant to the sTRAIL [27,28,33,35–37]. In this line, although LUV-TRAIL showed more pro-apoptotic potential than sTRAIL in sarcoma cell lines, they only induced a moderate cytotoxic effect in sTRAIL-resistant HT-1080 and RD cells. Therefore, we decided to combine LUV-TRAIL with several drugs described to sensitize sarcoma cells to TRAIL-induced apoptosis such as doxorubicin (DOX) [27], trabectedin (TRAB) [28], bortezomib (BORT) [38], and flavopiridol (FVP). Previous studies of our group on a breast cancer model, sensitization experiments also using flavopiridol were performed pre-incubating cancer cells before treatment with TRAIL (sTRAIL or LUV-TRAIL), as well as simultaneous treatment with FVP and both forms of TRAIL [23]. On that model, no differences were observed when cells were previously treated with FVP and then with TRAIL in comparison with simultaneous treatment. In this line, other studies carried out by us using multiple myeloma cells do not show differences between pre-incubation strategy and simultaneous treatment when TRAIL (sTRAIL or LUV-TRAIL) is combined with drugs (data not shown).

Among them, FVP was proven as the most efficient in the three sarcoma cell lines tested. Flavopiridol is a semisynthetic flavone that has showed a potent inhibitory effect on cell proliferation in sarcoma cells [39–41]. Flavopiridol has also been used in clinical trials, and even though was not effective as monotherapy [42], FVP potentiated the anti-tumor activity of other anti-tumor agents when was used in combination [43,44].

Our results demonstrate that FVP greatly sensitized not only to sTRAIL but also, and largely, to LUV-TRAIL. The cytotoxic effect of LUV-TRAIL in combination with FVP was fully attributed to TRAIL since the selected doses of FVP did not induce cell death per se. In this line, pre-incubation with the neutralizing antibody RIK2 fully inhibited cell death induced by the combined treatment. Cell death induced by the combination of FVP with TRAIL showed the typical morphological changes of apoptotic cell death such as blebbing, nuclear fragmentation, and chromatin condensation. Furthermore, this sensitization resulted in an increased activation of both caspase-8 and -3, which was completely inhibited by the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk and also by the caspase-8 inhibitor IETD-fmk. Altogether, these data indicate that combination of FVP with LUV-TRAIL was a caspase-dependent apoptotic process through the activation of the extrinsic apoptotic pathway. Moreover, when long-term effect of LUV-TRAIL was analyzed, this novel TRAIL formulation inhibited clonogenic cell growth largely than sTRAIL. Moreover, combination of FVP with both forms of TRAIL, mainly with LUV-TRAIL, enhanced long-term effect indicating that the combined treatment not only was more effective at short-term but also was prolonged over time as shown in clonogenic assays.

Several mechanisms have been described to explain FVP-induced TRAIL-sensitization, among them up-regulation of DR expression [23] or inactivation of anti-apoptotic proteins such as FLIP, XIAP, Mcl-1, or survivin [25,45,46]. Trying to ascertain the mechanisms involved in the synergy observed between FVP and LUV-TRAIL, we firstly analyzed DR expression upon FVP treatment. We previously demonstrated that DR up-regulation was a decisive sensitizing mechanism of FVP to TRAIL-induced apoptosis in breast cancer cells [23]. However, FVP did not modify either the expression of the pro-apoptotic TRAIL receptors or that of the decoy receptors in sarcoma cell lines, underscoring that sensitization mechanisms are different depending on the cancer type studied. In this line, we also did not observe DR up-regulation in lung cancer cells upon FVP treatment [22]. On the other hand, it has been described that FVP promotes degradation of anti-apoptotic proteins such as cFLIP, Mcl-1, and XIAP [25,45,46]. In agreement with previous studies, we observed that FVP induced a clear decrease of FLIP in all sarcoma cell lines tested. In fact, FVP induced a clear down-regulation of the short isoform of cFLIP (cFLIP_S), while no changes were observed for the long isoform of cFLIP (cFLIP_L), with the exception of A673 cells. It is noteworthy to point out that cFLIP_S is considered to be solely an anti-apoptotic protein promoting caspase-8 inhibition, while the role of cFLIP_L is not clear, and seems that the long isoform of cFLIP promotes or inhibits apoptosis depending on the relative amounts of both caspase-8 and cFLIP_L [47,48]. Interestingly, FVP also induced a clear decrease of XIAP expression in A463 cells, which also resulted to be the most sensitive cell line to the combined treatment of FVP with both TRAIL formulations. Although we have not performed specific experiments to address the precise contribution of XIAP down-regulation to FVP-mediated sensitization to TRAIL, this could at least partially explain the higher sensitizing effect of FVP in these cells compared to the other cell lines.

Summarizing, this study shows that LUV-TRAIL significantly improves the bioactivity of sTRAIL on sarcoma cells. Furthermore, the combination of LUV-TRAIL with FVP increased even more the cytotoxic potential of LUV-TRAIL, opening the door to new TRAIL-sensitization strategies of which LUV-TRAIL mainly could benefit. In conclusion, the present study validates our novel formulation of TRAIL based on anchoring this death ligand on liposome surface in sarcoma and could be of relevance in a future clinical application of TRAIL in this type of cancer.

4. Materials and Methods

4.1. Preparation of Lipid Nanoparticles Decorated with Soluble Recombinant TRAIL

LUV (Large Unilamellar Vesicles)-type lipid nanoparticles with soluble recombinant TRAIL (sTRAIL) tethered on their surface was performed as previously described [19,49]. Briefly, a mixture of phosphatidylcholine (PC), sphingomyelin (SM), cholesterol (CHOL), and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[[N-(5-amino-1-carboxypentyl)-iminodiacetic acid]succinyl] (nickel salt) (DOGS-NTA-Ni) (all from Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL; USA) in the weight ratio of 55:30:10:5 were firstly dried under

a nitrogen and next under vacuum. Lipid mixture with a composition resembling that of natural exosomes was resuspended in KHE buffer (100 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7.0, containing 0.1 mM EDTA). After that, resuspended lipids were freeze-thawed 10 times and extruded 10 times through two polycarbonate membranes with a pore size of 0.2 μm (Whatman, Maidstone, UK) using an extruder (Northern Lipids, Burnaby, BC, Canada). LUV were incubated in KHE buffer for 30 min at 37 °C with soluble recombinant TRAIL (sTRAIL), corresponding to amino acids 95–281 with a 6-histidine tag in its N-terminal extreme cloned into the pET-28c plasmid (Novagen, kindly provided by Dr. Marion MacFarlane) [50]. Then LUV with sTRAIL tethered on their surface (LUV-TRAIL) were ultracentrifugated for 6 h at 100,000 revolutions per minute at 4 °C, supernatant was removed, and finally, the pellet containing LUV-TRAIL was resuspended in an equal volume of sterile KHE buffer.

4.2. Cell Culture and Cytotoxicity Assays

A673 cells (derived from Ewing's sarcoma), HT-1080 cells (derived from fibrosarcoma), and RD cells (derived from rhabdomyosarcoma) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Sarcoma cell lines were routinely cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine and penicillin/streptomycin (i.e., complete medium) at 37 °C with a 5% CO_2 .

4.3. Cell Viability Assays

For cell viability quantification, cells (2.5×10^4 cells/well) were seeded in 96-well plates (100 μL /well) in complete medium and left overnight to be attached to the bottom. Cells were then treated with different concentrations (1–1000 ng/mL) of sTRAIL or LUV-TRAIL for 24 h. Cell viability was evaluated by a modification of 3-[4,5-di-methylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method of Mosmann as previously described [51]. Data was expressed as the percentage of cell viability with respect to control cells (untreated cells for sTRAIL, and cells treated with LUVs without TRAIL for LUV-TRAIL).

4.4. Cytotoxicity Assays

Cytotoxicity assays were performed as follows: 2×10^4 cells were seeded in 96-well plates in complete medium and left overnight to be attached to the bottom. After that, cells were treated with different concentrations of sTRAIL or LUV-TRAIL (1–1000 ng/mL) for 24 h. Then, apoptosis was measured by analyzing phosphatidyl-serine exposure on cell surface was analyzed to quantify apoptosis. For that, cells were incubated with 0.5 μg /mL annexin-V-APC, Immunostep, Salamanca, Spain) in annexin-binding buffer (ABB, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4) for 15 mins at room temperature. Finally, apoptosis quantification was carried out using a FACSCalibur flow cytometer and CellQuest software (BD Biosciences, Franklin Lakes, NY, USA).

Cell death inhibition assays were carried out by using the blocking anti-human TRAIL mAb (500 ng/mL, clone RIK2, BD Biosciences), with the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk (30 μM , Bachem, Bubendorf, Switzerland) or with the specific caspase-8 inhibitor IETD-fmk (30 μM , Bachem). Cells were pre-incubated with RIK2, z-VAD-fmk, or IET-fmk for 1 h prior to the addition of TRAIL (both sTRAIL and LUV-TRAIL).

4.5. Clonogenic Assay

Clonogenic survival was analyzed as previously described [22–24]. Briefly, 5000 cells per well were seeded into 6-well plates and left to be attached to the bottom overnight. The following day, cells were incubated with sTRAIL or LUV-TRAIL (300 ng/mL for A673 cells and 1000 ng/mL for HT-1080 and RD cells) for 24 h in presence or absence of FVP (50 nM for HT-1080 cells and 200 nM for A673 and RD cells). Then, culture medium was removed and replaced with fresh medium, and surviving cells were cultured for 10 days. After that, cells were washed twice with PBS, fixed with pure methanol for 30 min at 4 °C, and stained with crystal violet (1% in 50% ethanol). The measurement of the absorbance

at 550 nm after dissolving crystal violet with DMSO was performed for quantifying the clonogenic assays. Data were expressed as the percentage of absorbance with respect to the respective control (untreated cells).

4.6. Western Blot Analysis

The study of the expression of the main proteins involved in the extrinsic apoptotic pathway was carried out using Western blot analysis as previously described [19–21]. Briefly, cells (5×10^6) were lysed at 4 °C with 100 µL of a buffer containing 1% Triton X-100 and protease and phosphatase inhibitors. Then, lysated cells were separated by 12% SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and blocked with TBS-T buffer (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 0.12 M NaCl, 0.1% Tween-20, 0.05% sodium azide) containing 5% skimmed milk. PVDF membranes were incubated with mAbs against caspase-8 (BD Biosciences), caspase-3 (Cell Signaling, Danvers, MA; USA), Bid (BD Biosciences), PARP-1 (BD biosciences), caspase-9 (MBL, Woburn, MA; USA), cFLIP (clone NF6, Enzo, Farmingdale, NY, USA), Mcl-1 (Santa Cruz Biotech, Dallas, TX), Bcl-xL (Cell Signaling), or XIAP (BD Biosciences) in TBS-T containing 2% skimmed milk. Anti-β-actin mAb (Sigma, Saint Louis, MO; USA) was used as protein loading control. Pierce ECL Western Blotting Substrate (when used horseradish peroxidase-labeled secondary antibody, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) or the CDP-Star substrate (when used phosphatase alkaline-labeled secondary antibody, Merck, Darmstadt, Germany) were used to display the proteins.

4.7. Surface Expression of Death Receptors

The analysis of surface expression of death receptors was performed as follows: 1×10^5 cells were incubated with either anti-DR4, anti-DR5, anti-DcR1, anti-DcR2 monoclonal antibodies or isotype control, all of them PE-conjugated (eBioscience, San Diego, CA, USA) in PBS containing 5% FCS for 30 min at room temperature. Then, cells were analyzed by using a FACSCalibur flow cytometer and Cell Quest software (BD Biosciences).

4.8. Nuclear Staining

Hoechst 33342 staining was carried out for analyzing the nuclear morphological changes. Briefly, cells were seeded (10^5 cells) in 24-well plates in complete medium and incubated in presence or absence of FVP for 1 h (200 nM for A673 and RD cells and 50 nM for HT-1080 cells). After that, cells were treated with sTRAIL or LUV-TRAIL (1000 ng/mL) overnight. Then, cells were fixed with 4% PFA for 30 min, washed with PBS, and labeled with 1 µg/mL of Hoechst 33342 (Invitrogen, Dublin, Ireland). Finally, photographs were taken using a fluorescence microscope (E600/E400, Nikon, Tokyo, Japan) equipped with digital photograph system (DXM 1200F, Nikon) at original magnification at $400\times$.

4.9. Statistical Analysis

GraphPad Prism 5 software was used to carry out computer-based statistical analysis. Results showed indicate the mean \pm SD of at least three different experiments. Student's t test for non-paired variants was performed to evaluate statistical significance. A $p < 0.05$ value was considered to be significant.

Author Contributions: A.G.-L. performed almost all experiments. D.D.M. designed and performed several experiments and wrote the manuscript. A.A. supervised experiments and help to write the manuscript. L.M.-L. designed experimental work, supervised experiments, and wrote the manuscript.

Acknowledgments: This study has been funded by Instituto de Salud Carlos III through the project PI16/00526 (LML) (Co-funded by European Regional Development Fund/European Social Fund, "Investing in your future"). Ana Gallego-Lleida was supported by pre-doctoral fellowships from Gobierno de Aragón.

Conflicts of Interest: The authors have not conflict of interest. Alberto Anel and Luis Martinez-Lostao have filed a patent application (W02011020933) for the use of liposome-bound Apo2L/TRAIL.

References

1. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 7–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Borden, E.C.; Baker, L.H.; Bell, R.S.; Bramwell, V.; Demetri, G.D.; Eisenberg, B.L.; Fletcher, C.D.; Fletcher, J.A.; Ladanyi, M.; Meltzer, P.; et al. Soft tissue sarcomas of adults: State of the translational science. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 1941–1956. [[PubMed](#)]
3. Wilky, B.A.; Jones, R.L.; Keedy, V.L. The Current Landscape of Early Drug Development for Patients with Sarcoma. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* **2017**, *37*, 807–810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kawai, A.; Yonemori, K.; Takahashi, S.; Araki, N.; Ueda, T. Systemic Therapy for Soft Tissue Sarcoma: Proposals for the Optimal Use of Pazopanib, Trabectedin, and Eribulin. *Adv. Ther.* **2017**, *34*, 1556–1571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Gamie, Z.; Kaprinotis, K.; Papanikolaou, D.; Haagensen, E.; Da Conceicao Ribeiro, R.; Dalgarno, K.; Krippner-Heidenreich, A.; Gerrand, C.; Tsiridis, E.; Rankin, K.S. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) for bone sarcoma treatment: Pre-clinical and clinical data. *Cancer Lett.* **2017**, *409*, 66–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Pitti, R.M.; Marsters, S.A.; Ruppert, S.; Donahue, C.J.; Moore, A.; Ashkenazi, A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 12687–12690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Wiley, S.R.; Schooley, K.; Smolak, P.J.; Din, W.S.; Huang, C.P.; Nicholl, J.K.; Sutherland, G.R.; Smith, T.D.; Rauch, C.; Smith, C.A.; et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* **1995**, *3*, 673–682. [[CrossRef](#)]
8. Holland, P.M. Death receptor agonist therapies for cancer, which is the right TRAIL? *Cytokine Growth Factor Rev.* **2014**, *25*, 185–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Lemke, J.; von Karstedt, S.; Zinngrebe, J.; Walczak, H. Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell Death Differ.* **2014**, *21*, 1350–1364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Micheau, O.; Shirley, S.; Dufour, F. Death receptors as targets in cancer. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *169*, 1723–1744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Von Karstedt, S.; Montinaro, A.; Walczak, H. Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 352–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Martinez-Lostao, L.; Marzo, I.; Anel, A.; Naval, J. Targeting the Apo2L/TRAIL system for the therapy of autoimmune diseases and cancer. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *83*, 1475–1483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Wajant, H.; Gerspach, J.; Pfizenmaier, K. Engineering death receptor ligands for cancer therapy. *Cancer Lett.* **2013**, *332*, 163–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. De Miguel, D.; Lemke, J.; Anel, A.; Walczak, H.; Martinez-Lostao, L. Onto better TRAILs for cancer treatment. *Cell Death Differ.* **2016**, *23*, 733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Bernardi, S.; Secchiero, P.; Zauli, G. State of art and recent developments of anti-cancer strategies based on TRAIL. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* **2012**, *7*, 207–217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Lim, B.; Allen, J.E.; Prabhu, V.V.; Talekar, M.K.; Finnberg, N.K.; El-Deiry, W.S. Targeting TRAIL in the treatment of cancer: New developments. *Expert Opin. Ther. Targets* **2015**, *19*, 1171–1185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Martinez-Lorenzo, M.J.; Anel, A.; Gamen, S.; Monlen, I.; Lasier, P.; Larrad, L.; Pineiro, A.; Alava, M.A.; Naval, J. Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *J. Immunol.* **1999**, *163*, 1274–1281. [[PubMed](#)]
18. Monleon, I.; Martinez-Lorenzo, M.J.; Monteagudo, L.; Lasier, P.; Taules, M.; Iturralde, M.; Pineiro, A.; Larrad, L.; Alava, M.A.; Naval, J.; et al. Differential secretion of Fas ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 6736–6744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. De Miguel, D.; Basanez, G.; Sanchez, D.; Malo, P.G.; Marzo, I.; Larrad, L.; Naval, J.; Pardo, J.; Anel, A.; Martinez-Lostao, L. Liposomes decorated with Apo2L/TRAIL overcome chemoresistance of human hematologic tumor cells. *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 893–904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. De Miguel, D.; Gallego-Lleyda, A.; Anel, A.; Martinez-Lostao, L. Liposome-bound TRAIL induces superior DR5 clustering and enhanced DISC recruitment in histiocytic lymphoma U937 cells. *Leuk. Res.* **2015**, *39*, 657–666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

21. De Miguel, D.; Gallego-Lleyda, A.; Galan-Malo, P.; Rodriguez-Vigil, C.; Marzo, I.; Anel, A.; Martinez-Lostao, L. Immunotherapy with liposome-bound TRAIL overcome partial protection to soluble TRAIL-induced apoptosis offered by down-regulation of Bim in leukemic cells. *Clin. Transl. Oncol.* **2015**, *17*, 657–667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. De Miguel, D.; Gallego-Lleyda, A.; Ayuso, J.M.; Erviti-Ardanaz, S.; Pazo-Cid, R.; del Agua, C.; Fernandez, L.J.; Ochoa, I.; Anel, A.; Martinez-Lostao, L. TRAIL-coated lipid-nanoparticles overcome resistance to soluble recombinant TRAIL in non-small cell lung cancer cells. *Nanotechnology* **2016**, *27*, 185101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. De Miguel, D.; Gallego-Lleyda, A.; Ayuso, J.M.; Pawlak, A.; Conde, B.; Ochoa, I.; Fernandez, L.J.; Anel, A.; Martinez-Lostao, L. Improved Anti-Tumor Activity of Novel Highly Bioactive Liposome-Bound TRAIL in Breast Cancer Cells. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* **2016**, *11*, 197–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. De Miguel, D.; Gallego-Lleyda, A.; Ayuso, J.M.; Pejenaute-Ochoa, D.; Jarauta, V.; Marzo, I.; Fernandez, L.J.; Ochoa, I.; Conde, B.; Anel, A.; et al. High-order TRAIL oligomer formation in TRAIL-coated lipid nanoparticles enhances DR5 cross-linking and increases antitumour effect against colon cancer. *Cancer Lett.* **2016**, *383*, 250–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Fandy, T.E.; Ross, D.D.; Gore, S.D.; Srivastava, R.K. Flavopiridol synergizes TRAIL cytotoxicity by downregulation of FLIPL. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2007**, *60*, 313–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Gamén, S.; Anel, A.; Pérez-Galán, P.; Laserra, P.; Johnson, D.; Piñeiro, A.; Naval, J. Doxorubicin treatment activates a Z-VAD-sensitive caspase, which causes deltapسيم loss, caspase-9 activity, and apoptosis in Jurkat cells. *Exp. Cell Res.* **2000**, *258*, 223–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Wang, S.; Ren, W.; Liu, J.; Lahat, G.; Torres, K.; Lopez, G.; Lazar, A.J.; Hayes-Jordan, A.; Liu, K.; Bankson, J.; et al. TRAIL and doxorubicin combination induces proapoptotic and antiangiogenic effects in soft tissue sarcoma in vivo. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 2591–2604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Harati, K.; Chromik, A.M.; Bulut, D.; Goertz, O.; Hahn, S.; Hirsch, T.; Klein-Hitpass, L.; Lehnhardt, M.; Uhl, W.; Daigeler, A. TRAIL and taurolidine enhance the anticancer activity of doxorubicin, trabectedin and mafosfamide in HT1080 human fibrosarcoma cells. *Anticancer Res.* **2012**, *32*, 2967–2984. [[PubMed](#)]
29. Balsas, P.; Lopez-Royuela, N.; Galan-Malo, P.; Anel, A.; Marzo, I.; Naval, J. Cooperation between Apo2L/TRAIL and bortezomib in multiple myeloma apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *77*, 804–812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Shanker, A.; Brooks, A.D.; Tristan, C.A.; Wine, J.W.; Elliott, P.J.; Yagita, H.; Takeda, K.; Smyth, M.J.; Murphy, W.J.; Sayers, T.J. Treating metastatic solid tumors with bortezomib and a tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor agonist antibody. *J. Natl. Cancer Inst.* **2008**, *100*, 649–662. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Frezza, A.M.; Stacchiotti, S.; Gronchi, A. Systemic treatment in advanced soft tissue sarcoma: What is standard, what is new? *BMC Med.* **2017**, *15*, 109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Lazar, A.J.; Trent, J.C.; Lev, D. Sarcoma molecular testing: Diagnosis and prognosis. *Curr. Oncol. Rep.* **2007**, *9*, 309–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Harati, K.; Emmelmann, S.; Behr, B.; Goertz, O.; Hirsch, T.; Kapalschinski, N.; Kolbenschlager, J.; Stricker, I.; Tannapfel, A.; Lehnhardt, M.; et al. Evaluation of the safety and efficacy of TRAIL and taurolidine use on human fibrosarcoma xenografts in vivo. *Oncol. Lett.* **2016**, *11*, 1955–1961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kang, Z.; Sun, S.Y.; Cao, L. Activating Death Receptor DR5 as a Therapeutic Strategy for Rhabdomyosarcoma. *ISRN Oncol.* **2012**, *2012*, 395952. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Hotta, T.; Suzuki, H.; Nagai, S.; Yamamoto, K.; Imakiire, A.; Takada, E.; Itoh, M.; Mizuguchi, J. Chemotherapeutic agents sensitize sarcoma cell lines to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced caspase-8 activation, apoptosis and loss of mitochondrial membrane potential. *J. Orthop. Res.* **2003**, *21*, 949–957. [[CrossRef](#)]
36. Karlisch, C.; Harati, K.; Chromik, A.M.; Bulut, D.; Klein-Hitpass, L.; Goertz, O.; Hirsch, T.; Lehnhardt, M.; Uhl, W.; Daigeler, A. Effects of TRAIL and taurolidine on apoptosis and proliferation in human rhabdomyosarcoma, leiomyosarcoma and epithelioid cell sarcoma. *Int. J. Oncol.* **2013**, *42*, 945–956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Li, X.; Huang, T.; Jiang, G.; Gong, W.; Qian, H.; Zou, C. Proteasome inhibitor MG132 enhances TRAIL-induced apoptosis and inhibits invasion of human osteosarcoma OS732 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *439*, 179–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

38. Lu, G.; Punj, V.; Chaudhary, P.M. Proteasome inhibitor Bortezomib induces cell cycle arrest and apoptosis in cell lines derived from Ewing's sarcoma family of tumors and synergizes with TRAIL. *Cancer Biol. Ther.* **2008**, *7*, 603–608. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Cai, D.; Latham, V.M., Jr.; Zhang, X.; Shapiro, G.I. Combined depletion of cell cycle and transcriptional cyclin-dependent kinase activities induces apoptosis in cancer cells. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 9270–9280. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Jiang, J.; Matraga, C.B.; Cai, D.; Latham, V.M., Jr.; Zhang, X.; Lowell, A.M.; Martelli, F.; Shapiro, G.I. Flavopiridol-induced apoptosis during S phase requires E2F-1 and inhibition of cyclin A-dependent kinase activity. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 7410–7422. [\[PubMed\]](#)
41. Li, Y.; Tanaka, K.; Li, X.; Okada, T.; Nakamura, T.; Takasaki, M.; Yamamoto, S.; Oda, Y.; Tsuneyoshi, M.; Iwamoto, Y. Cyclin-dependent kinase inhibitor, flavopiridol, induces apoptosis and inhibits tumor growth in drug-resistant osteosarcoma and Ewing's family tumor cells. *Int. J. Cancer* **2007**, *121*, 1212–1218. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Morris, D.G.; Bramwell, V.H.; Turcotte, R.; Figueredo, A.T.; Blackstein, M.E.; Verma, S.; Matthews, S.; Eisenhauer, E.A. A Phase II Study of Flavopiridol in Patients with Previously Untreated Advanced Soft Tissue Sarcoma. *Sarcoma* **2006**, *2006*, 64374. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Dickson, M.A.; Rathkopf, D.E.; Carvajal, R.D.; Grant, S.; Roberts, J.D.; Reid, J.M.; Ames, M.M.; McGovern, R.M.; Lefkowitz, R.A.; Gonen, M.; et al. A phase I pharmacokinetic study of pulse-dose vorinostat with flavopiridol in solid tumors. *Investig. New Drugs* **2011**, *29*, 1004–1012. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Luke, J.J.; D'Adamo, D.R.; Dickson, M.A.; Keohan, M.L.; Carvajal, R.D.; Maki, R.G.; de Stanchina, E.; Musi, E.; Singer, S.; Schwartz, G.K. The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol potentiates doxorubicin efficacy in advanced sarcomas: Preclinical investigations and results of a phase I dose-escalation clinical trial. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 2638–2647. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Palacios, C.; Yebes, R.; Lopez-Rivas, A. Flavopiridol induces cellular FLICE-inhibitory protein degradation by the proteasome and promotes TRAIL-induced early signaling and apoptosis in breast tumor cells. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 8858–8869. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Miyashita, K.; Shiraki, K.; Fuke, H.; Inoue, T.; Yamanaka, Y.; Yamaguchi, Y.; Yamamoto, N.; Ito, K.; Sugimoto, K.; Nakano, T. The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Int. J. Mol. Med.* **2006**, *18*, 249–256. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Feoktistova, M.; Geserick, P.; Kellert, B.; Dimitrova, D.P.; Langlais, C.; Hupe, M.; Cain, K.; MacFarlane, M.; Hacker, G.; Leverkus, M. cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Mol. Cell* **2011**, *43*, 449–463. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Pop, C.; Oberst, A.; Drag, M.; Van Raam, B.J.; Riedl, S.J.; Green, D.R.; Salvesen, G.S. FLIP(L) induces caspase 8 activity in the absence of interdomain caspase 8 cleavage and alters substrate specificity. *Biochem. J.* **2011**, *433*, 447–457. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Martinez-Lostao, L.; Garcia-Alvarez, F.; Basanez, G.; Alegre-Aguaron, E.; Desportes, P.; Larrad, L.; Naval, J.; Jose Martinez-Lorenzo, M.; Anel, A. Liposome-bound APO2L/TRAIL is an effective treatment in a rheumatoid arthritis model. *Arthritis Rheum.* **2010**, *62*, 2272–2282. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. MacFarlane, M.; Ahmad, M.; Srinivasula, S.M.; Fernandes-Alnemri, T.; Cohen, G.M.; Alnemri, E.S. Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 25417–25420. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
51. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63. [\[CrossRef\]](#)



Article

Double-Edged Lipid Nanoparticles Combining Liposome-Bound TRAIL and Encapsulated Doxorubicin Showing an Extraordinary Synergistic Pro-Apoptotic Potential

Diego De Miguel ^{1,2,*}, Ana Gallego-Lleyda ^{1,3,†}, Miguel Martinez-Ara ¹, Javier Plou ¹, Alberto Anel ^{1,3} and Luis Martinez-Lostao ^{3,4,5,6,7,*}

- ¹ Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain; anna89@hotmail.com (A.G.-L.); mmartinezara@gmail.com (M.M.-A.); javierplou@gmail.com (J.P.); anel@unizar.es (A.A.)
- ² Cell Death, Cancer and Inflammation Group, University College of London, London WC1E 6BT, UK
- ³ Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón (ISS), 50009 Zaragoza, Spain
- ⁴ Servicio de Inmunología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, 50009 Zaragoza, Spain
- ⁵ Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Universidad de Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain
- ⁶ Instituto de Nanociencia de Aragón, 50018 Zaragoza, Spain
- ⁷ Instituto de Ciencias de los Materiales de Aragón, 50009 Zaragoza, Spain
- * Correspondence: diego.samaniego@ucl.ac.uk (D.D.M.); lumartin@unizar.es (L.M.-L.)
- † These authors contributed equally to this paper.

Received: 1 November 2019; Accepted: 28 November 2019; Published: 5 December 2019



Abstract: Although TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand, also known as Apo2L) was described as capable of inducing apoptosis in transformed cells while sparing normal cells, limited results obtained in clinical trials has limited its use as an anti-tumor agent. Consequently, novel TRAIL formulations with enhanced bioactivity are necessary for overcoming resistance to conventional soluble TRAIL (sTRAIL) exhibited by many primary tumors. Our group has generated artificial liposomes with sTRAIL anchored on their surface (large unilamellar vesicle (LUV)-TRAIL), which have shown a greater cytotoxic activity both in vitro and in vivo when compared to sTRAIL against distinct hematologic and epithelial carcinoma cells. In this study, we have improved LUV-TRAIL by loading doxorubicin (DOX) in its liposomal lumen (LUVDOX-TRAIL) in order to improve their cytotoxic potential. LUVDOX-TRAIL killed not only to a higher extent, but also with a much faster kinetic than LUV-TRAIL. In addition, the concerted action of the liposomal DOX and TRAIL was specific of the liposomal DOX and was not observed when with soluble DOX. The cytotoxicity induced by LUVDOX-TRAIL was proven to rely on two processes due to different molecular mechanisms: a dynamin-mediated internalization of the doxorubicin-loaded particle, and the strong activation of caspase-8 exerted by the liposomal TRAIL. Finally, greater cytotoxic activity of LUVDOX-TRAIL was also observed in vivo in a tumor xenograft model. Therefore, we developed a novel double-edged nanoparticle combining the cytotoxic potential of DOX and TRAIL, showing an exceptional and remarkable synergistic effect between both agents.

Keywords: TRAIL; liposomes; cancer immunotherapy; caspase-8; doxorubicin; endocytosis

1. Introduction

TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand, also known as Apo2L) is a death ligand that belongs to the TNF cytokine super-family. Its selective pro-apoptotic ability on transformed cells,

leaving normal cells unaffected [1–3], sparked the interest in using this protein as a potential therapeutic strategy in cancer [4,5]. In fact, a large number of clinical trials were carried out using TRAIL-based therapy on a wide variety of human cancers, reaching phase II/III [6]. Unfortunately, although proven safe, TRAIL-based therapies showed very limited therapeutic activity in clinical trials [7–9]. Therefore, better sensitization strategies can be useful in order to overcome the resistance of cancer cells to TRAIL [10–13]. In this line, a wide variety of drugs of different nature that can act in combination with TRAIL, sensitizing cancer cells to apoptosis induced by this death ligand, have been described. In fact, TRAIL has been combined, among others, with the proteasome inhibitor bortezomib [14], the cdk inhibitor flavopiridol [15], the histone deacetylase inhibitor vorinostat [16], the flavonoid quercetin [17], and the cytostatic drugs paclitaxel [18], actinomycin D [19], or doxorubicin [20]. On the other hand, novel TRAIL formulations with improved bioactivity can also be of great usefulness for its future clinical application in order to overcome TRAIL resistance [21–26]. These TRAIL formulations include highly stable TRAIL trimers [3,27], fusion proteins with single-chain variable antibody fragments (scFv) that active target TRAIL to cancer cells [28–31] or immune cells [32,33], mutant variants with specificity to DR5 [34,35], and different types of nanoparticles [36–42]. In this line, our group generated an original formulation of TRAIL based on immobilizing TRAIL molecules on the surface of artificial lipid nanoparticles (large unilamellar vesicle (LUV)-TRAIL), resembling the natural TRAIL-containing exosomes secreted by activated human T-cells [43,44]. We already demonstrated that LUV-TRAIL exhibited an enhanced anti-tumor activity when compared to soluble TRAIL (sTRAIL) against leukemic cells resistant to TRAIL or to chemotherapeutic drugs [37,45,46], and on epithelial carcinoma cells both in vitro and in vivo [47–49]. The increased cytotoxicity of LUV-TRAIL relied on its ability to induce an improved DR5 clustering leading to an enhanced DISC recruitment in comparison to sTRAIL [45,49]. However, although LUV-TRAIL has proven more efficient than sTRAIL in all tumor cell lines tested, some cancer cell lines remain somewhat resistant to its pro-apoptotic activity. Therefore, seeking to optimize the original LUV-TRAIL formulation to overcome the resilient TRAIL-resistance of some cancer cells, we have generated a novel liposomal formulation combining LUV-TRAIL with a chemotherapeutic drug encapsulated inside the lipid nanoparticle. Concerning the drug to be encapsulated, after performing a research work and considering several options among the already described liposomal drugs, liposomal doxorubicin (DOX) was finally chosen. Liposomal DOX was one of the first encapsulated drugs to be developed, more than 20 years ago, and its anti-tumor bioactivity has been assessed in a great number of scientific articles (reviewed in Reference [50]). In this line, the use of liposomal DOX assembled to the erythrocyte leveraged chemotherapy (ELeCt) platform in cancer treatment has been recently reported [51]. In this work, the authors demonstrate that liposomal DOX using the ELeCt platform is highly effective against lung metastasis in a melanoma model. Doxorubicin has been described to synergize with TRAIL when administered in combination in several studies [38,52–55]. Beyond DOX has been reported to synergize with TRAIL, its liposomal was chosen due to scientific literature about the preparation and characterization of liposomal DOX, which can be easily found (reviewed in Reference [56]). Moreover, from an experimental point of view, the encapsulation protocol of DOX perfectly suited the coupling process of TRAIL with LUV, so both processes (encapsulation and coupling) could be easily combined with minor modifications. Thus, we devised the generation of a unique formulation combining both TRAIL and DOX (LUVDOX-TRAIL), which could be of great interest to overcome the resistance of different types of cancer. Therefore, we used the liposomal particle of LUV-TRAIL as a vehicle for DOX, resembling the well-known liposomal formulation of DOX, but combining it with the superior pro-apoptotic potential of LUV-TRAIL, generating LUVDOX-TRAIL. This double-edged new formulation can potently and simultaneously trigger the intrinsic and the extrinsic apoptotic pathways to induce a great cytotoxic effect against tumor cells. Indeed, this new liposomal formulation exhibited an outstanding pro-apoptotic potential, greatly improving the performance of LUV-TRAIL in all cancer cells tested. It is noteworthy that LUVDOX-TRAIL was capable of overcoming the resistance to LUV-TRAIL in highly TRAIL-resistant cancer lines. Moreover, LUVDOX-TRAIL with a defined low concentration of DOX maintained their

greater anti-tumor effect both in vitro and in vivo while sparing normal cells. Our results show that this optimized double-edged LUV-TRAIL formulation harbors an enhanced exceptional cytotoxic ability and could be potentially useful to improve anti-tumor therapy against TRAIL-resistant cancers.

2. Results

2.1. Synthesis and Characterization of Large Unilamellar Vesicle Doxorubicin-TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (LUVDOX-TRAIL)

Large unilamellar vesicles (LUVs) encapsulating DOX inside their lumen and decorated with TRAIL on their surface (LUVDOX-TRAIL (LDT)) (Figure 1a) were synthesized as outlined in the protocol shown in Figure 1b. DOX was encapsulated inside the liposomal lumen using the pH gradient method, as described in the Material and Methods Section. In short, this method relies on the generation of a pH difference between the liposomal lumen (low pH) and the external media (neutral pH). Thus, DOX molecules passively diffuse from the media to the liposomal lumen, where the low pH induces a protonation of the DOX molecule, rendering it insoluble and therefore unable to cross the lipid barrier, being entrapped inside the liposomes. As shown in Figure 1d, this method rendered an entrapment efficiency of around 97%. Assuming this encapsulation efficiency, the final concentration of encapsulated DOX was 1.4 mM (Figure 1c). In contrast, as expected, classic LUVs bearing PBS in the liposomal lumen (LUV-PBS) showed a rather poor encapsulation efficiency. Cryo-TEM assessment confirmed the presence of a homogeneous population of liposomal particles of around 100 nm of diameter, similarly to LUV-TRAIL (LT) [57]. Of note, a black aggregate inside the liposomes could also be observed, corresponding to the precipitated insoluble DOX, which is a typical feature of liposomal DOX encapsulation (Figure 1e).

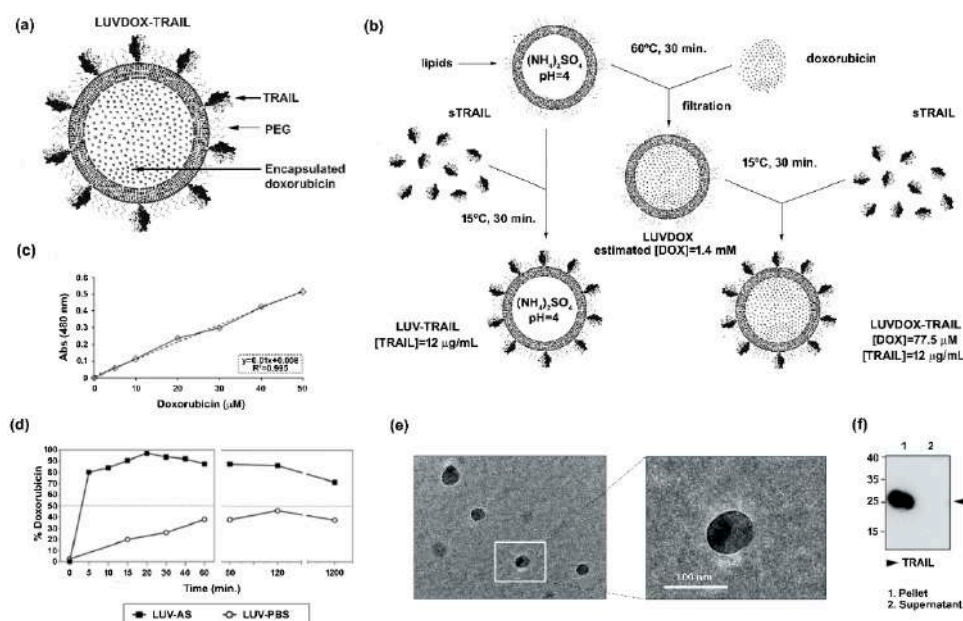


Figure 1. (a) Schematic representation of large unilamellar vesicle doxorubicin-TNF-related apoptosis-inducing ligand (LUVDOX-TRAIL (LDT)). (b) Schematic illustration of the generation of LDT. Generation of LDT was performed as describe in the Experimental Section. (c) Standard curve of doxorubicin concentration. Absorbance at 480 nm of the indicated concentrations of doxorubicin (DOX) was measured. The DOX standard curve was used to interpolate the results obtained in (d). (d) Encapsulation efficiency and release profile of doxorubicin in LUV-AS. DOX was incubated with LUV-AS at a molar ratio of 1:3.8 (drug:lipid) for 30 min at 60 °C. At the indicated times, samples were taken and free DOX was separated from the liposomal fraction. Encapsulated DOX was quantified by

measurement of absorbance at 480 nm. Efficiency is represented as percentage of total doxorubicin present in the liposomal fraction in every time point. (e) Scanning electron microscopy of LDT was carried out as described in the Experimental Section. Original magnification was 45,000 \times . (f) Coupling efficiency of soluble TRAIL in the LDT formulation. Once LUVDOX-TRAIL were generated, they were ultra-centrifuged at 60,000 rpm for 5 h, collecting the supernatant and resuspending the pellet. Aliquots from the pellet and the supernatant fractions were separated by SDS-PAGE and the presence of TRAIL in both fractions was assessed by Western blot.

Once the feasibility and efficiency of the DOX encapsulation method were proven, the next step was to attach sTRAIL on their surface. For that, sTRAIL was incubated with LUVDOX (LD) at the same protein/lipid ratio as in the classic LT [37] to obtain the LDT formulation. Importantly, sTRAIL was coupled to LD by incubating at 15 °C instead of the classic 37 °C used for LT to diminish possible leakage of DOX. However, this lower incubation temperature did not compromise sTRAIL attachment to the liposomal surface. As shown in Figure 1f, the coupling efficiency was very high and similar to that of classic LT [57], validating the modification of the protocol. Therefore, the final concentration of DOX and TRAIL within LDT was 775 μ M and 12 μ g/mL, respectively.

2.2. *In Vitro* Cytotoxic Potential of LUVDOX-TRAIL

The anti-tumor activity of LDT was tested on a panel of cell lines, composed mainly by TRAIL-resistant cell lines (Supplementary Figure S1). As shown in Figure 2, LDT showed an exceptional cytotoxic activity on all cell lines tested, proving more efficiency than LT and LD, respectively. In this regard, although LD alone induced some cytotoxicity on some cell lines, this was rather limited in most cases (Figure 2a). The cells presented the typical features of apoptotic cell death, such as blebbing and cell shrinkage. Importantly, the effect of LDT was not observed when LT was co-administered in combination with increasing concentrations of soluble DOX up to more than 15-fold that of LDT (Figure 2c), suggesting a specific synergism between the liposomal DOX and liposome-bound TRAIL. Next, we measured the killing kinetic of LDT. As shown in Figure 2d, LDT showed a much faster cytotoxic kinetic than both LD and LT. In all epithelial cancer cell lines, LDT reached the maximum cell death after six hours (Figure 2d, upper panels). Moreover, in A549 and SKBR3 cells, the onset of cell death could be observed already after two hours. On the other hand, LDT showed a slower kinetic on sarcoma cell lines, reaching maximum levels at 20 hours (Figure 2d, bottom panels). In all cases, LD only showed a limited cytotoxic exposure effect, with LDT being significantly more potent in all cases. Altogether, our results show a unique synergistic effect between the surface-bound TRAIL and the encapsulated DOX, which cannot be achieved by LT, LD, or an equivalent concentration of soluble DOX.

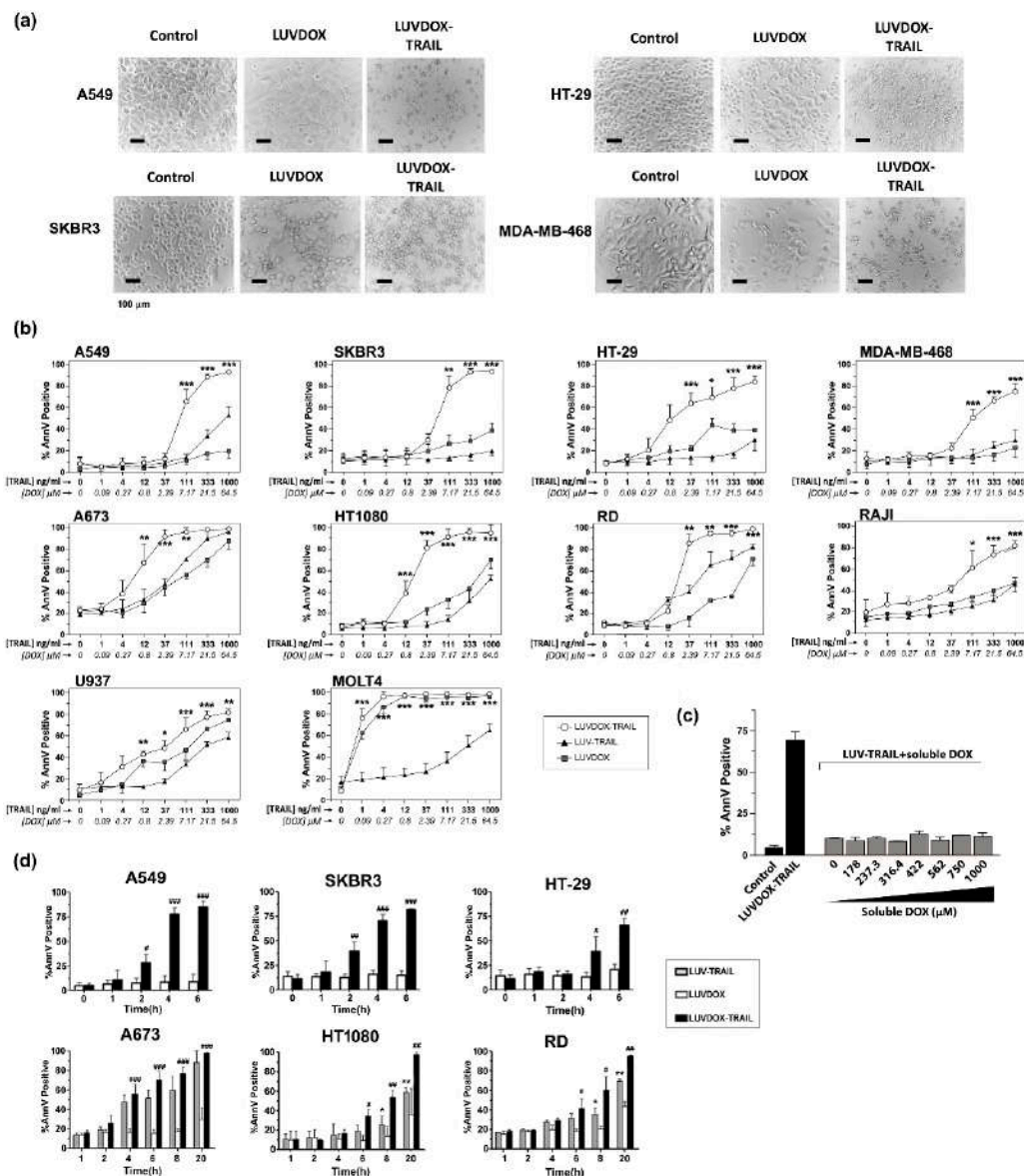


Figure 2. (a) Cytotoxicity of LUVDOX-TRAIL (LDT) on a panel of tumor cell lines from distinct origin. A549, HT-29, SKBR3, and MDA-MB-468 cells were treated with LUV-TRAIL (LT), LUVDOX (LD), or LDT (TRAIL at 1 μ g/mL) for 24 h. Bright field microscopy images of the Control, and cells treated with LD and LDT, were taken. Original magnification was 200 \times . (b) A panel of tumor cell lines (A549, HT-29, SKBR3, MDA-MB-468, A673, HT-1080, Raji, RD, U937, and MOLT4) were treated with increasing concentrations of LT, LD, or LDT for 24 h. The following day, cell death was measured by annexin-V staining. Graphs show the mean \pm standard deviation (SD) of at least three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (c) Combined treatment of LT with increasing concentrations of soluble DOX on A549 cells. A549 cells were treated with LT (1000 ng/mL) in combination with increasing concentrations of soluble DOX for 3 h. Besides, LDT was also used as a reference. Results are the mean \pm SD of three independent experiments. (d) Time-course cytotoxicity of LDT on the tumor cell cells: A549, SKBR3, HT-29, A673, HT-1080, and RD cells. Cells were treated with LD or LDT at their maximum concentrations (1 μ g/mL TRAIL; 64.56 μ M DOX) for the indicated times. Apoptotic cells were measured by annexin-V staining. Graphs show the mean \pm SD of four different experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, LT versus LDT # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ LD versus LDT.

2.3. LUVDOX-TRAIL are able to Induce a Stronger Activation of the Extrinsic Apoptotic Pathway than LUV-TRAIL in Cancer Cells

Next, we set out to characterize the nature of the cell death induced by LDT. First, the role of TRAIL in the cytotoxicity exerted by LDT was analyzed by blocking TRAIL (Figure 3a). Pre-incubation with the TRAIL-blocking antibody RIK completely protected all cell lines from LDT-induced cytotoxicity. On the other hand, the exposure of phosphatidylserine detected by annexin-V staining in the cytotoxicity experiments suggested a classic apoptotic process. To corroborate that, the role of caspases in LDT was explored. First, sarcoma cell lines HT-1080 and RD were incubated with sTRAIL, LT, LD, and LDT for 20 hours and activation of the main caspases involved in the extrinsic apoptotic pathway was assessed by Western blot (Figure 3b, upper panels). Activation of caspase-8 and caspase-3 was clearly increased when sarcoma cells were treated with LT compared to sTRAIL, as previously described [58]. Moreover, cleavage of Bid and PARP-1, the specific substrates for caspases-8 and -3 respectively, correlated with the activation of both caspases. It is noteworthy that LD had no effect on caspase activation. In contrast, LDT induced a stronger caspase activation than both LD and LT, which correlated with a higher cell death induction in the same experiments (Figure 3b, bottom panels). When analyzed in a time-course setting, LDT again showed a much faster ability to activate caspases -8 and -3 (Figure 3c). It is worth noting that LDT also induced a quick and strong activation of caspase-9. Overall, while LD did not induce any noticeable activation of any of the three caspases analyzed, LDT induced a clear and strong activation of the three caspases even from the 30-minute time point. Interestingly, the three caspases seemed to be activated simultaneously. With that aim, analysis of caspase activation after pre-incubation with the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk was carried out in sarcoma cells (Figure 3d). Treatment with z-VAD-fmk abrogated caspase activation almost completely both in HT-1080 and RD cells treated with LT and with LDT. Moreover, cleavage of Bid and PARP-1, the specific substrates for caspases-8 and -3 respectively, were also fully inhibited when cells were treated with z-VAD-fmk. Having corroborated that LDT induced a strong caspase activation, we next checked if caspases were the main driver of LDT cytotoxicity. Thus, A549, SKBR3, and HT-29 cells were subjected to LDT treatment, in the presence or absence of the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk or the specific caspase-8 inhibitor z-IETD-fmk (Figure 3e). Both caspase inhibitors were able to revert cell death almost completely. All the results pointed towards LDT-induced apoptosis being a purely caspase-8-dependent process. In order to corroborate the role of caspase-8, the rhabdomyosarcoma cell line RH4, which is known to lack caspase-8 [59], was also studied. LDT did not have any cytotoxic effect on RH4 cells (Supplementary Figure S2a), therefore corroborating the main role of caspase-8 in LDT-induced apoptosis. In this line, silencing caspase-8 in SKBR3 cells completely abrogated LDT-induced cell death (Supplementary Figure S2b). Finally, given the double-edged nature of LDT, being a priori able to trigger both the extrinsic and the intrinsic apoptotic pathways, and considering the strong activation of caspase-9 observed in Figure 3c, we also checked the activation of the intrinsic apoptotic pathway by using modified HCT-116 cells lacking both Bax and Bak (HCT-116 BB), therefore lacking a functional mitochondrial apoptotic pathway [49] (Supplementary Figure S2c). HCT-116 BB cells were completely resistant to LDT, suggesting an important role for the mitochondrial apoptotic pathway in LDT-induced cell death.

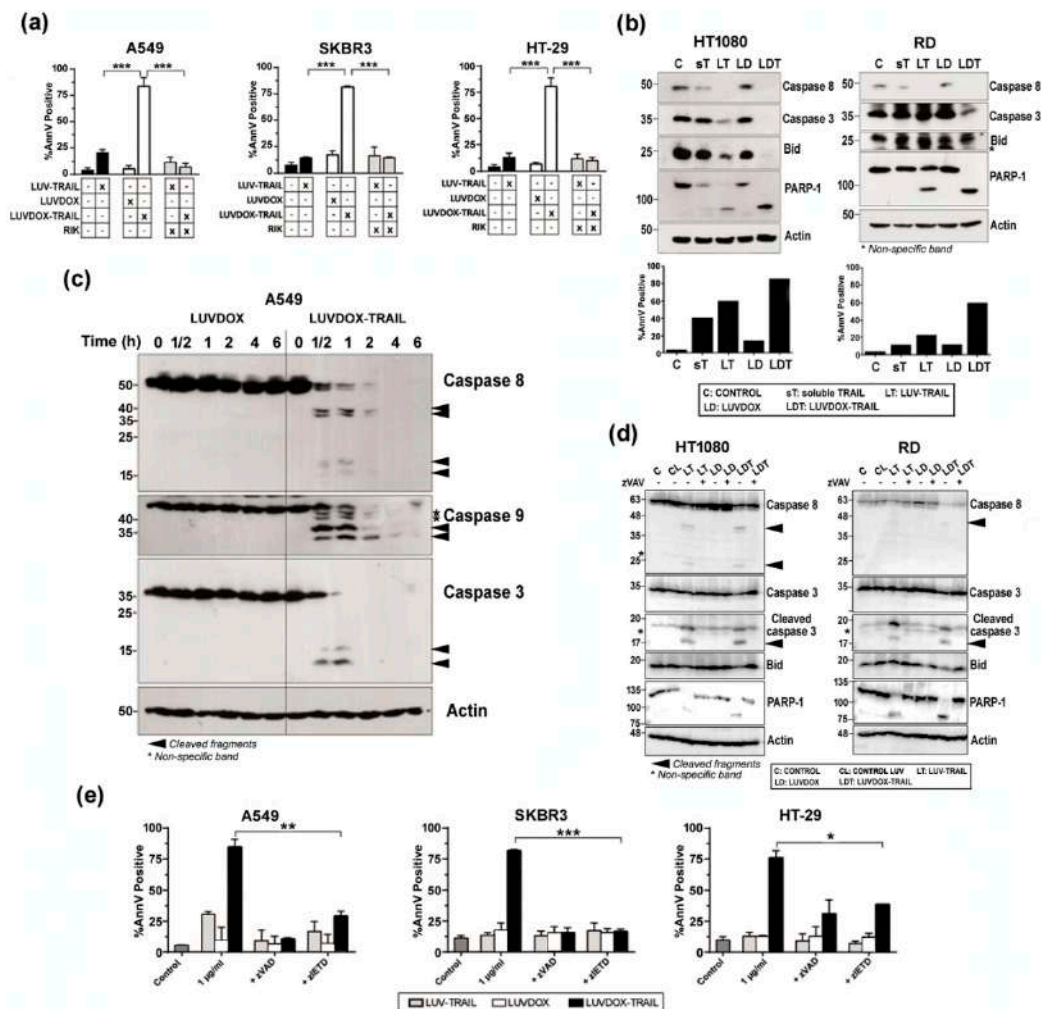


Figure 3. (a) Roles of DOX and TRAIL in LUVDOX-TRAIL (LDT) cytotoxicity. A549, SKBR3, and HT-29 cells were treated with the indicated combinations of LUV-TRAIL (LT), LUVDOX (LD), and LDT (TRAIL at 1000 ng/mL). When indicated, cells were pre-treated with the TRAIL-blocking antibody RIK. Cell death was assessed by annexin-V staining after 6 h of treatment. Graphs show the mean \pm SD of at least four experiments. *** $p < 0.001$. (b) Analysis of caspase activation after treatment with different TRAIL versions. HT-1080 and RD cells were untreated (Control, designed as C), or treated with soluble TRAIL (ST), LT, LD, and LDT at 1000 ng/mL. After 24 h, cells were lysed, and lysates were subjected to SDS-PAGE and to Western blot analysis. Levels of caspase-8, caspase-3, Bid, and PARP-1 were analyzed using specific antibodies. The level of actin levels was used as a control for equal protein loading. Cell death was quantified in parallel by flow cytometry after annexin-V staining (bottom panels). (c) Analysis of time-course caspase activation with LD or LDT. A549 cells were treated with LD or LDT (1 μ g/mL TRAIL; 64.56 μ M DOX) at the indicated times. Finally, cells were lysed, and lysates were subjected to SDS-PAGE and to Western blot analysis. (d) Analysis of caspase activation after treatment with different TRAIL versions. HT-1080 and RD cells were untreated (Control, designed as C), or treated with LUV alone (CL), LT, LD, and LDT at 1000 ng/mL. When indicated, cells were pre-treated with the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk (30 μ M). After 24 h, cells were lysed, and lysates were subjected to SDS-PAGE and to Western blot analysis. Levels of caspase-8, caspase-3, Bid, and PARP-1 were analyzed using specific antibodies. Actin levels was used as a control for equal protein loading. (e) Role of caspases in LDT cytotoxicity. A549, SKBR3, and HT-29 cells were treated with LT, LD, or LDT (TRAIL at 1000 ng/mL). When indicated, cells were pre-treated either with the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk (30 μ M) or with the specific caspase-8 inhibitor z-IETD-fmk (30 μ M) for 1 hour. Cell death was assessed by annexin-V staining after 6 h of treatment. Graphs show the mean \pm SD of at least four experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

2.4. LUVDOX-TRAIL-Induced Cytotoxicity is a Dynamin-Dependent Mechanism Involving Caspase-8 Activity

Although the involvement of TRAIL in LDT cytotoxicity was clear, the contribution of DOX to the cell death was still elusive. Indeed, the uptake mechanism of LD and LDT was still unclear. To perform a more detailed analysis of the role of DOX in both liposomal formulations (LD and LDT), A549 cells were subjected to time-course stimulation with both liposomal formulations, and DOX fluorescence was analyzed by microscopy. As shown in Figure 4a, both LD and LDT could be readily detected inside the cells already after 15 minutes of treatment. This fluorescence remained mostly unchanged for LD, whereas in LDT-treated cells, the red fluorescence pattern dramatically changed, adopting a very condensed aspect over time, and localizing in what could be identified as the nucleus. It is worth noting that no apoptosis could be detected in LD-treated cells, correlating with our previous results. In addition, the sharp DOX condensation only occurred in cells undergoing apoptosis (white arrows in $T = 120$), suggesting a cause–effect correlation between apoptosis and DOX localization in the nucleus.

Interestingly, the fluorescence pattern observed for both LD and LDT at short times appeared to localize in a somehow defined cellular compartment, rather than being dispersed in the cytosol ($T = 15$). Having proven that encapsulated DOX both in LD and LDT was endocytosed, and taking into consideration previous studies reporting the lysosomal localization of DOX after treatment with liposomal doxorubicin [60], we considered the possibility of DOX being localized in the endosomal compartment. To corroborate this, a specific lysosomal marker (Lysotracker™) was used in parallel to LD or LDT administration (Figure 4b). After 60 minutes of exposure, almost all DOX fluorescence co-localized with Lysotracker™ in A549 cells treated with LD. However, when treated with LDT, most of DOX fluorescence already seemed to be located at the nucleus, whilst only a faint red fluorescence could be observed outside the nucleus, seemingly co-localizing with the lysosomal tracker, suggesting that at least part of the DOX would still remain in the lysosomes.

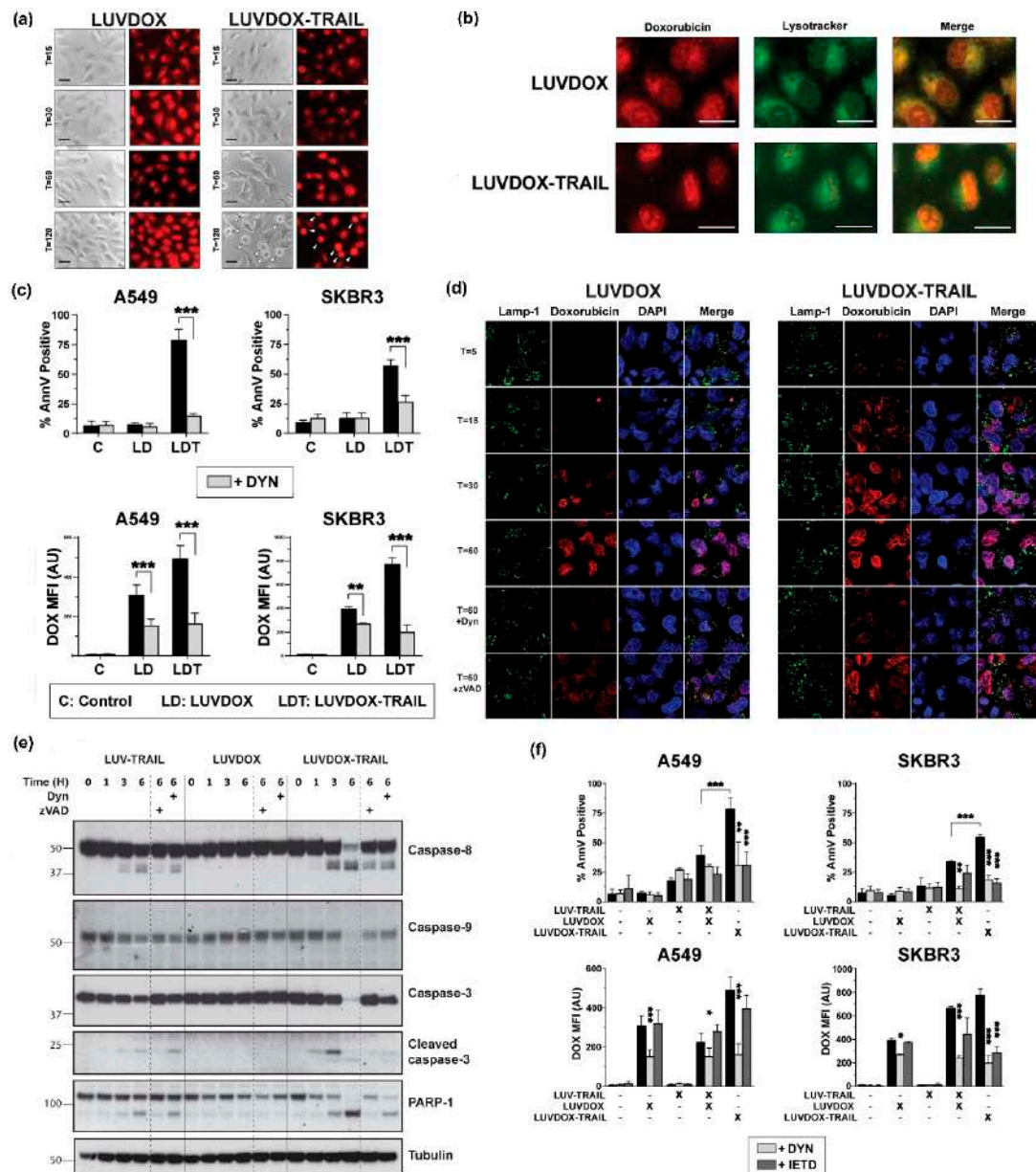


Figure 4. (a) Fluorescence microscopy of A549 upon treatment with LD or LDT. A549 cells were treated with LD or LDT at their maximum working concentrations (1 μ g/mL TRAIL; 64.56 μ M DOX) at the indicated times. At the final time, medium was carefully replaced, and cells were cooled for 10 minutes at 4 $^{\circ}$ C. Finally, bright field and red fluorescence pictures were taken by fluorescence microscopy. (b) Subcellular location of LD and LDT. A549 cells were pre-treated for 1 h with LysotrackerTM. Then, cells were treated with LD or LUVDOX-TRAIL (TRAIL, 1000 ng/mL TRAIL) for 1 h. At the final time, medium was replaced, and cells were cooled for 10 min at 4 $^{\circ}$ C. Finally, green and red fluorescence pictures were taken by fluorescence microscopy. Original magnification was 400 \times . (c) Inhibitory effect of dynasore on cell death and DOX fluorescence of upon treatment with LD or LDT. A549 and SKBR3 cells were treated with LD or LDT for 3 h. In some cases, cells were pre-treated with dynasore (DYN, 80 μ M) for 1 h. Cell death was measured by annexin-V staining and DOX uptake was quantified by red-fluorescence measurement, respectively. Graphs show the mean \pm SD of four independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (d) Confocal microscopy of A549 upon treatment with LD or LDT. A549 cells were treated with LD or LDT at their maximum working concentrations (1 μ g/mL TRAIL; 64.56 μ M DOX) at the indicated times. In some cases, cells were pre-treated with dynasore (DYN, 80 μ M) or z-VAD-fmk (zVAD, 30 μ M) for 1 hour. Cells were stained with antibody anti-LAMP-1 and the probe DAPI. At the final time, medium was carefully replaced, and cells were

cooled for 10 minutes at 4 °C. Finally, fluorescence pictures were taken by confocal microscopy. (e) Analysis of the time-course activation of caspases after treatment with LT, LD, and LDT. A549 cells were treated with LT, LD, and LDT at 1000 ng/mL. When indicated, cells were pre-treated either with DYN (80 µM) or z-VAD-fmk (30 µM). After, cells were lysed, and lysates were subjected to SDS-PAGE and to Western blot analysis. Levels of caspase-8, caspase-9, caspase-3, and PARP-1 were analyzed using specific antibodies. Level of actin was used as a control for equal protein loading. (f) Effect of combined treatment of LD and LUV-TRAIL on cell-death and DOX-fluorescence. Tumor cells were treated with LD and LUV-TRAIL alone, or with the combination of both LD and LUV-TRAIL for 3 h. Besides, LDT was used in parallel as a reference. In some cases, cells were pre-treated with dynasore (DYN, 80 µM) or z-IETD-fmk (zIETD, 30 µM) for 1 hour. (e) Cell death was measured by annexin-V staining and (f) DOX uptake was quantified by red-fluorescence measurement, respectively. Graphs show the mean \pm SD of five independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Next, we characterized the involvement of the endocytic pathway in LD- and/or LDT-induced cell death using the specific dynamin inhibitor Dynasore (DYN) [61]. A549 and SKBR3 cells were pre-treated with DYN for one hour prior to the addition of LD or LDT and apoptosis induction was measured at three hours to analyze the early cell death induced by LDT (Figure 4c). Of note, DOX uptake by the cells was also assessed by measuring its characteristic red fluorescence by flow cytometry. In the absence of DYN, cytotoxicity perfectly correlated with previous data. When cells were pre-treated with DYN, cell death induced by LDT was abrogated in both cell lines. Regarding DOX fluorescence, in general, both LD and LDT presented high MFI levels in both cell lines, although fluorescence was slightly higher for LDT. Interestingly, similarly to apoptosis levels, fluorescence levels were significantly reduced by DYN. All of this data strongly suggested a role for dynamin in the uptake of the liposomal DOX into the lysosomal compartment, regardless of the presence of TRAIL on the liposomal surface and proved that DOX requires to be internalized in order to exert its cytotoxicity. A deeper analysis by confocal microscopy in A549 cells following a time-course treatment with either LD or LDT further corroborated these observations (Figure 4d). Thus, while DOX could be readily detected colocalizing with the lysosomal marker LAMP-1 already after 5 minutes of stimulation with LDT, DOX could only be clearly detected after 30 minutes of stimulation in the case of LD. Moreover, in LDT-treated cells, DOX fluorescence co-localized with DAPI already after 15 minutes, and almost all DOX was present inside the nuclei after 30 minutes. In the case of LD, the uptake was much slower, with DOX only beginning to be clearly detected inside the cells after 30 minutes, and overall to a lesser extent than LDT.

Remarkably, when A549 cells were pre-treated with DYN, co-localization of DOX with DAPI was dramatically decreased both in LD-treated and LDT-treated cells. Interestingly, pre-treatment with z-VAD-fmk also decreased the amount of DOX into the nuclei, although to a lesser extent than DYN. When analyzed by Western blot, LT and LDT showed a clear activation of the caspase cascade, although LDT again showed a more robust activation and cleavage of all caspases and substrates analyzed (Figure 4e). LD did not induce any activation of any caspase, including caspase-9. As expected, caspase activation was reduced after z-VAD-fmk treatment. Interestingly, pre-treatment with DYN also diminished caspase activation.

Finally, we wanted to assess whether LT administered in combination with LD should render a similar outcome to LDT. For that, experiments using LD along with LT were carried out on A549 and SKBR3 cells, comparing with LDT. To dissect the roles of the endocytic process on the one hand and of TRAIL-induced caspase-8 activation on the other, cells were pre-treated with DYN and with z-IETD-fmk, and both apoptosis induction and DOX fluorescence were measured (Figure 4f). LDT was again the most cytotoxic agent. Interestingly, the combination of LD and LT showed a substantial synergy to induce cell death in both cell lines. Importantly, both DYN and z-IETD-fmk were able to abrogate apoptosis induced by LDT or by the combination of LT and LD. Regarding intracellular fluorescence, the result was similar to that observed in Figure 4a, where LD and LDT showed similar fluorescence patterns. In this case, the combination of LD and LT rendered similar results to LD alone

or LDT. Moreover, the dynamin inhibitor DYN not only blocked DOX fluorescence upon treatment with LD or LDT, but also with the combination of LT and LD. Remarkably, the caspase-8 inhibitor z-IETD-fmk significantly reduced DOX fluorescence levels in the points where TRAIL was involved, indicating that DOX fluorescence intensity was also dependent of caspase-8 activity.

2.5. Reduction of DOX Concentration in LUVDOX-TRAIL Reduces Their Toxicity on Normal Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) but Maintain Cytotoxicity on Cancer Cells

After assessing the greater cytotoxic effect of LDT in all cancer cell lines tested, and having characterized its mechanism of action, we next sought to test the possible cytotoxicity of this new formulation on normal primary cells. For that purpose, cytotoxicity of LDT was analyzed on freshly isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and on activated T-cells (or T-cell blasts) generated from those PBMC (Supplementary Figure S3). LDT induced cell death on PBMC and on day-6 T-cell blasts after 24 hours of treatment when used at the usual concentrations of DOX and TRAIL (64 μ M of DOX and 1 μ g/mL of TRAIL, respectively) (Supplementary Figure S3a,b). Toxicity was similar on both CD4⁺ and CD8⁺ 6-day T-cell blasts subpopulations (Figure S3c,d), and it was clearly due to DOX, since LD exhibited a similar cytotoxicity pattern. In order to decrease LDT toxicity on normal cells, LDT with a concentration of DOX 10 times lower than those previously described (hereafter LDT 1/10) but with the same concentration of TRAIL were generated. Reduction of the concentration of encapsulated DOX to 6.4 μ M eliminated the toxicity of LDT on freshly isolated PBMCs and considerably reduced the cytotoxicity on 6-day T-cell blasts (Supplementary Figure S3a,b). Finally, the cytotoxic potential of LDT 1/10 was assessed, as in Figure 2, using the same cell lines (Figure 5). Reduction of encapsulated DOX in liposomal composition reduced the cytotoxic potential of LD and LDT. However, although slightly reduced, importantly, LDT 1/10 still retained a strong activity against all cancer lines tested, still being the most potent formulation (Figure 5).

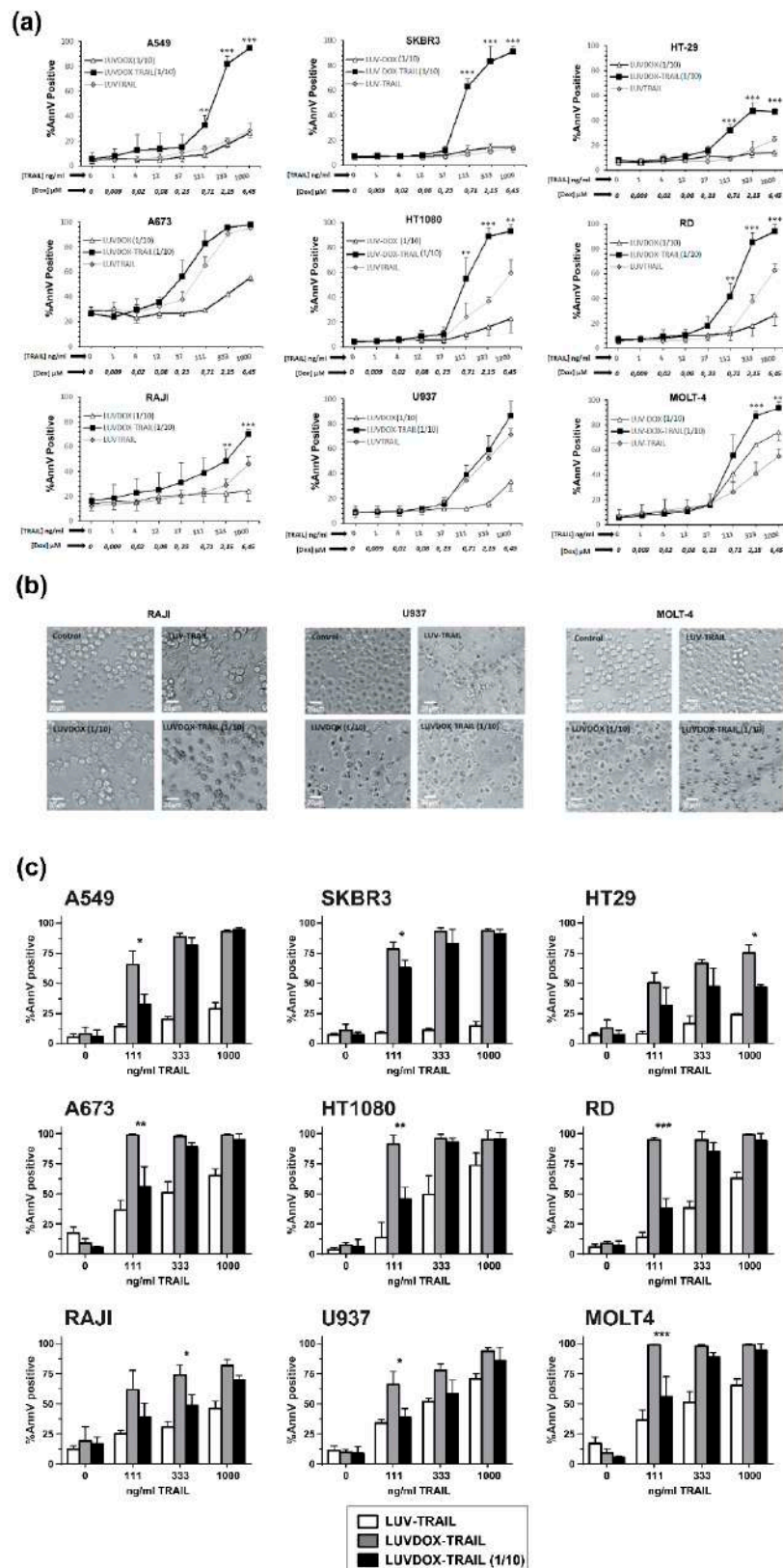


Figure 5. (a) Cytotoxicity of LUVDOX-TRAIL 1/10 (LDT 1/10) on a panel of tumor cell lines from distinct origin. A panel of tumor cell lines (A549, HT-29, SKBR3, A673, HT-1080, Raji, RD, U937, and MOLT4) were treated with increasing concentrations of LUV-TRAIL (LT), LUVDOX 1/10 (LD 1/10), or LDT 1/10 with entrapped DOX concentration of DOX: 6.45 Mm (DOX 1/10). After 24 h, cell death was measured by annexin-V staining. Graphs show the mean \pm SD of at least three independent experiments. * $p < 0.05$,

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (b) Cytotoxicity of LDT 1/10 on a panel of tumor cell lines from distinct origin. Raji, U937, and MOLT-4 cells were treated with LT, LD 1/10, or LDT 1/10 for 24 h. Bright field microscopy images of the Control, and cells treated with LD and LDT, were taken. Original magnification was 200 \times . (c) Comparison of LDT and LDT 1/10 on a panel of tumor cell lines from distinct origin. A panel of tumor cell lines (A549, HT-29, SKBR3, A673, HT-1080, Raji, RD, U937, and MOLT4) were treated with LT, LDT, and LDT 1/10 with different entrapped DOX concentrations (LDT: DOX at 64.56 μ M or LDT 1/10: DOX at 6.45 μ M). The final concentration of TRAIL was 1000 ng/mL in all cases. After 24 h, cell death was quantified by annexin-V staining. Graphs show the mean \pm SD of at least three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

2.6. In Vivo Cytotoxic Potential of LUVDOX-TRAIL

Next, we sought to assess the in vivo efficiency of LDT. However, and given the high cytotoxicity of LDT in vitro, we first checked the safety of LDT, to rule out any overt adverse effect in vivo. Thus, both LT and LDT were systemically injected in mice. No sign of inflammatory infiltrate, fibrosis, or necrosis in any tissue were observed (Figure 6a). Moreover, there was no increase in ALT or AST serum levels after treatment with LDT, excluding in vivo hepatotoxicity, a well-known adverse effect described for TRAIL (Figure 6b) [62]. Therefore, we could conclude that LDT do not present systemic toxicity, and they can be used as a therapeutic agent in vivo.

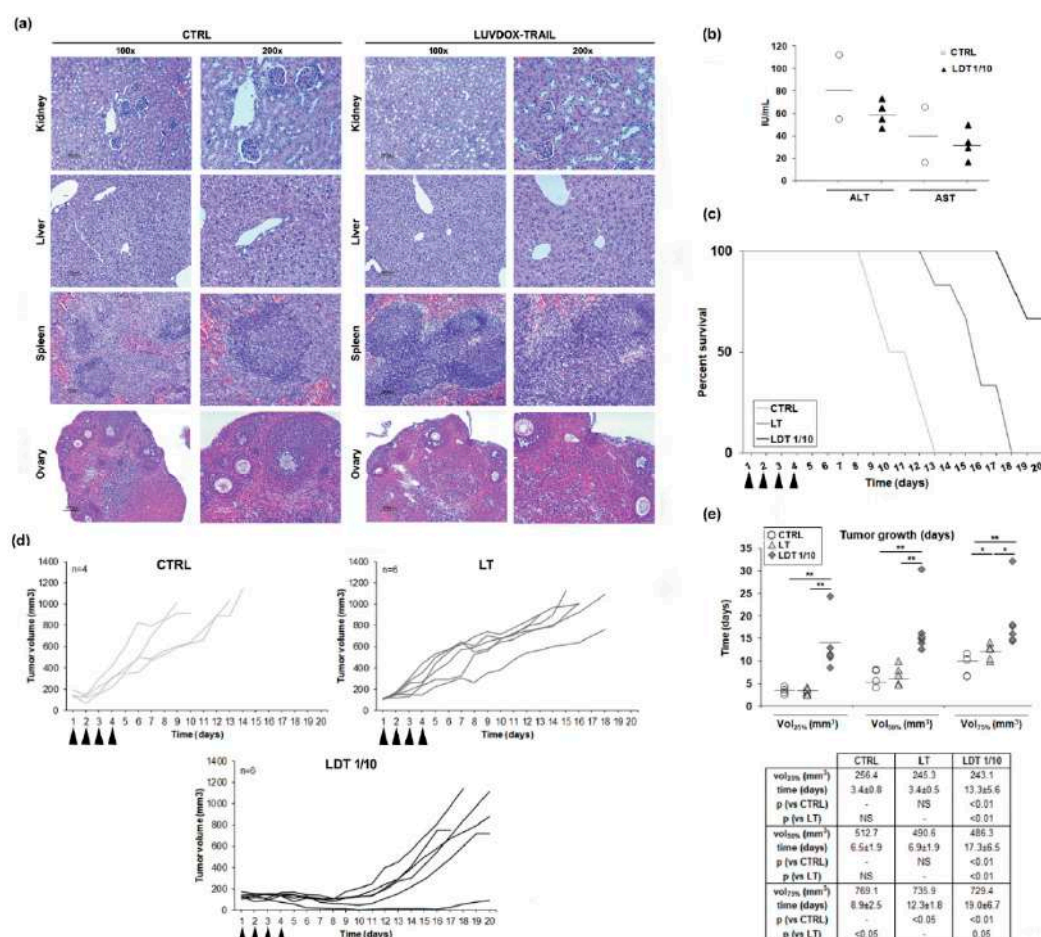


Figure 6. (a) Histological analysis of different tissues derived from LUV-DOX-TRAIL 1/10-treated mice. Mice were subjected to systemic LUVDOX-TRAIL 1/10 (LDT 1/10) treatment 4 times with an interval of 2 days. After that, organs were surgically dissected and fixed in 10% buffered formalin. After fixation for 3 days, tissues were embedded in paraffin and sectioned in 5 μ m sections. The slides

were then deparafined in xylene, dehydrated in a gradient of alcohols, and stained using hematoxylin and eosin (H and E). Original magnification was at 100× and 200×. **(b)** Determination of serum levels of AST and ALT in LDT 1/10-treated mice. Mice were subjected to systemic LUV-TRAIL treatment 4 times with an interval of 2 days. After that, mice were sacrificed, and blood samples were collected by heart puncture. Blood samples were then centrifuged to obtain serum, and AST and ALT levels were analyzed in the obtained serum samples by nephelometry. Graphics represent the results as a dot plot of the data collected from 4 mice in the LDT 1/10 group and 2 mice in the control group. **(c)** Mice bearing HT-1080 tumors received intra-peritoneal injections of PBS, LUV-TRAIL (LT, 36 µg of TRAIL/injection), or LUVDOX-TRAIL 1/10 (LDT 1/10, 36 µg of TRAIL/injection) for 4 days (arrow-pointed). Percent survival of mice from the control, LT, and LDT 1/10 groups was monitored for 20 days. Results are expressed as a Kaplan-Meier graphic. **(d)** In vivo anti-tumor activity of LUV-TRAIL and LUVDOX-TRAIL 1/10. Mice bearing HT-1080 tumors received intra-peritoneal injections of PBS, LUV-TRAIL (LT, 36 µg of TRAIL/injection), or LUVDOX-TRAIL 1/10 (LDT 1/10, 36 µg of TRAIL/injection) for 4 days (arrow-pointed). Tumor growth is depicted, calculated using the formula: tumor volume = $L \times W \times H$ (where L is length, W is width, and H is the height dimensions of the tumor respectively). **(e)** Time-course analysis of the tumor growth in mice bearing HT-1080 tumors. Tumor volumes corresponding to 25%, 50%, and 75% respectively, of the final volume at the moment of the sacrifice in every group were calculated. Time (in days) at which tumors reached these volumes in every group was calculated and expressed as dot plot of animals in each group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Next, we tested the efficacy of LDT on a subcutaneous xenograft model. Thus, Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu} mice bearing subcutaneous HT-1080 tumors were treated intraperitoneally with daily injections of either LT or LDT 1/10 for four consecutive days (described in the Materials and Methods Section). Tumor volumes were monitored, and mice were culled when the tumor volume reached 100 mm². All control mice were culled at day 13, while mice treated with LT survived until day 18. In the case of mice treated with LDT, 66.7% (4 animals of 6 included in this group) survived until day 20 (Figure 6c). Mice treated with LT showed a slower tumor growth, whilst mice treated with LDT showed a marked growth delay (Figure 6d). To corroborate the delay in tumor growth, the time average that the tumors took to reach the 25%, 50%, and 75% of the final volume at the moment of the sacrifice in every group was analyzed (Figure 6e). Although no differences were observed in the time average at which the control and LT groups reached the 25% and 50% of the tumor growth, mice treated with LT presented a significant delay in the time they took to reach 75% of the tumor growth when compared to the control group. On the other hand, tumors of mice treated with LDT took significantly longer to reach 25%, 50%, and 75% of the tumor volume when compared to both the control and LT groups.

3. Discussion

TRAIL-based therapies in cancer exhibited very limited therapeutic activity in clinical trials [6–9], therefore, novel TRAIL formulations with improved bioactivity that can overcome TRAIL resistance would be of utility as cancer treatment [21–26]. In this regard, we have demonstrated in the present study that LDT exhibited a greatly improved cytotoxicity against a broad panel of cancer cells from distinct origins, overcoming resistance to sTRAIL or to LT, while LD alone did not show a remarkable cytotoxic effect in the case of epithelial cells, in which cytotoxicity was dependent on the presence of TRAIL. In the case of sarcoma cells, LD contributed to the cytotoxic effect, but the presence of TRAIL enhanced cytotoxicity even more. Finally, in hematological cancer cell lines, with the exception of MOLT4 cells, in which the greater cytotoxicity observed with LDT seemed to be attributable rather to DOX, cytotoxicity was due to the combination of TRAIL and DOX. In any case, the use of TRAIL and DOX in a unique formulation such as LDT exhibited an enhanced cytotoxic effect when compared to LT or LD alone on all cell lines tested, overcoming the resistance to sTRAIL. In this line, soluble DOX has been long described to synergize with sTRAIL when administered in combination [53–55,63,64]. However, this synergy happened at minimum incubation times of at least 12 hours, while the effect observed with LDT happened in a much shorter time frame. Moreover, a synergistic effect of LT with

soluble DOX at 64.56 μM cannot be achieved. However, the effective amount of DOX that would actually get inside the cells when liposomal DOX was used might be much higher. In other words, liposomal DOX might be more effective than soluble DOX entering the cells, so the effective intracellular concentration of DOX could be much higher when liposomal DOX were used. Thereby, to observe a theoretical synergistic effect of soluble DOX with LT similar to that occurring in LDT, the concentration of soluble DOX should be much higher. However, when LT were used in combination with soluble DOX with increasing concentrations of soluble DOX up to a maximum of 1 mM, no cytotoxic effect was observed, ruling out any synergistic effect of LT with soluble DOX. Moreover, although previous studies have shown that DOX synergizes with soluble TRAIL to kill cancer cells, inhibition of cell death by the blocking antibody RIK clearly reflected a pivotal role for TRAIL in LDT-mediated cytotoxicity and was in agreement with the fact that LD alone had a rather low cytotoxicity. Besides, the data obtained clearly indicates that the cell death induced by LDT is a classic caspase-dependent apoptotic process, relying on TRAIL-mediated caspase-8 activation.

Then, the involvement of the endocytic pathway in LD- and/or LDT-induced cell death was analyzed, trying to ascertain the mechanism underlying the enhanced cytotoxic effect exhibited by LDT. In this regard, dynamin-dependent endocytosis has been described to be involved in the cellular uptake of the liposomal DOX formulation Doxil® [60]. Therefore, we blocked dynamin-dependent endocytosis by using the specific dynamin inhibitor Dynasore (DYN) [61]. Indeed, DYN was able to block endocytosis of both liposomal formulations, and especially cell death induced by LDT. Moreover, both LD and LDT appeared to be internalized in a similar manner and stored at lysosomes, although with different kinetics. The differences between both liposomal formulations would arise at that point, where the apoptotic signal triggered by liposomal TRAIL would somehow act in synergy with DOX located inside the lysosomes. According to this scenario, a situation in which LT were administered in combination with LD should render a similar outcome to LDT. In fact, although a similar effect could be obtained by treating the cells with LD and LT in parallel, LDT presents the advantage of assuring the simultaneous action of both agents (DOX and TRAIL), maximizing the pro-apoptotic efficiency. Taking the results altogether, the cytotoxicity induced by LDT was caspase-8- and TRAIL-dependent and involved an endocytosis mechanism dependent of dynamin. The mechanism proposed to explain the cytotoxic effect of LDT is summarized in Figure 7.

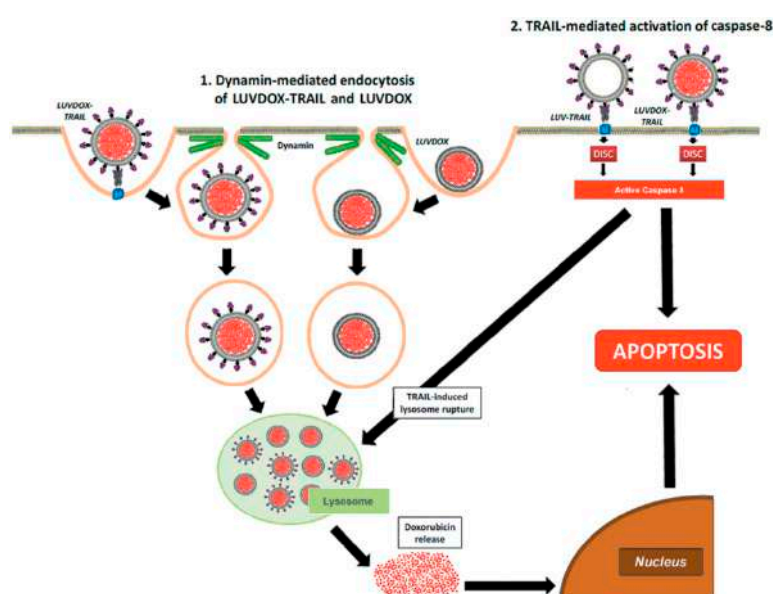


Figure 7. Schematic illustration of the mechanism proposed for cytotoxic effect of LUVDOX-TRAIL.

First, a dynamin-dependent endocytosis of the liposome-encapsulated DOX occurred. In fact, microscopy and flow cytometry results showed that LD was captured by the cells independently of

the presence of TRAIL on the liposomal surface. In line with this, the commercial liposomal DOX formulations used in cancer treatment have been proven to be internalized by dynamin-dependent mechanisms [60]. Hence, both LD and LDT would end up sequestered in lysosomes after being endocytosed. It is precisely at this point when the caspase-8 activated by the liposome-displayed TRAIL would come into action by triggering the lysosomal rupture, facilitating the release of free DOX to the cytosol, and finally, its translocation to the nucleus, unleashing a potent apoptotic process. In fact, lysosomal permeabilization by active caspase-8 has already been described in the literature [65–67]. Interestingly, this model is only valid for liposome-displayed TRAIL, since soluble TRAIL did not show any synergistic effect when administered in parallel with LD (data not shown). This would highlight the need for a robust caspase-8 activation, which could only be provided by LT or LDT.

Novel liposomal formulation anchoring TRAIL on the surface and encapsulating DOX inside lumen, that is LDT, exhibited an extraordinary cytotoxic effect against a wide range of tumor types; however, it was also cytotoxic on freshly isolated PBMC and on activated T lymphocytes. Therefore, LDT with a concentration of DOX 10 times less than those previously described but with the same concentration of TRAIL, named LDT 1/10, was also generated in order to diminish LDT toxicity on normal cells. In fact, LDT 1/10 was not toxic on neither PBMC nor activated T lymphocytes. These results agree with previous data indicating that neither sTRAIL nor LT induced significant cell death on T-cells [37,46,68], and demonstrate that LDT with a lower concentration of DOX did not cause cytotoxic effects on normal cells. However, the reduction of DOX concentration into LDT could hamper their cytotoxicity against cancer cells. As expected, LDT 1/10 exhibited slightly less cytotoxicity than LDT, though the reduction was only minute, and all cells were still largely sensitive to the 1/10 version of LDT. All these data, taken together, indicate that optimization of the concentration of DOX encapsulated inside the liposomal lumen allows it to retain its cytotoxicity against tumor cells but suppress toxicity for normal cells.

Finally, we wanted to assess the *in vivo* anti-tumor activity of LDT. First, and before starting any *in vivo* approximation, was a possible systemic toxicity exerted by LDT 1/10. In fact, his-tagged sTRAIL was shown to have a cytotoxic effect on primary human hepatocytes [69,70]. Therefore, a pilot study was designed seeking to analyze LDT 1/10 *in vivo* safety. Serum obtained by blood samples from mice treated with LDT 1/10 was analyzed to determine the levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), clinical markers for liver health, by standard protocols, as previously described [57]. At the same time, liver, kidney, spleen, and ovaries were also surgically extracted to perform a histological analysis of any possible tissular damage induced by LDT 1/10. The analysis of serum levels of the transaminases alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) did not show relevant changes when comparing LDT 1/10 treated mice with control mice. In addition, the normal tissue architecture was conserved in all tissues analyzed, including hepatic tissue. No signs of inflammatory infiltrate, fibrosis, or necrosis could be detected in any tissue in mice treated with LDT 1/10. Therefore, it could be concluded that LDT 1/10 did not induce any systemic toxicity on any tissue analyzed, validating their use *in vivo*. Once any systemic toxicity of LDT 1/10 was discarded, their anti-tumor activity was analyzed in an *in vivo* model using HT1080-xenograft tumors in nude mice. LDT 1/10 was able to slow down the tumor growth in a significant manner when compared to untreated animals and most importantly, when compared to LT. These results confirmed that LDT not only showed high *in vitro* bioactivity but also a strong *in vivo* anti-tumor activity.

4. Materials and Methods

4.1. Generation of Different Versions of Lipid Nanoparticles Decorated with TRAIL

Large unilamellar vesicles (LUVs) with soluble TRAIL (sTRAIL) tethered on their surface (hereafter LT) were generated as previously described [37,57]. Briefly, LUV-type lipid nanoparticles were generated with the following lipid composition: phosphatidylcholine, sphingomyelin, cholesterol, 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine)-N-(methoxy(polyethylene glycol)-2000)

(ammonium salt) (18:0 PEG2000-PE), and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-((N-(5-amino-1-carboxypentyl)-iminodiacetic acid)succinyl) (nickel salt) (DOGS-NTA-Ni) (Avanti Polar Lipids) with a weight ratio of 50:30:10:5:5. After that, sTRAIL (rTRAIL-His₆, corresponding to amino acids 95–281, kindly provided by Dr. M. MacFarlane [71]) was attached to their surface by incubation at 37 °C for 30 minutes.

Large unilamellar vesicles (LUVs) with DOX encapsulated inside their lumen and decorated with TRAIL on their surface (hereafter LDT, Figure 1a) were synthesized as outlined in the protocol shown in Figure 1b. The method used for generation of LDT was the pH gradient method [72,73]. First, LUVs were prepared by using 300 mM (NH₄)₂SO₄ (ammonium sulphate, AS) at pH = 4 to resuspend the dry lipid film for generating LUV-AS. Once extruded, LUV-AS were filtrated through a PD-10 desalting column (GE Healthcare) to create a pH and ion gradient between the external medium and the liposomal lumen by exchanging the external buffer to PBS. After that, LUV-AS were incubated with DOX at a molar drug-to-lipid ratio of 1/3.8 at 60 °C for 30 minutes, shaking at 800 rpm for obtaining LUV with DOX encapsulated inside (LUVDOX, hereafter LD), and then they were incubated with sTRAIL to obtain LDT. The final concentrations of total lipid, TRAIL, and DOX were 2.5 mM, 12 µg/mL and 775 µM, respectively. LDT with a concentration of DOX 10 times less than those previously described (LDT 1/10) was also generated. To assess the encapsulation efficiency of DOX inside the liposomal lumen, the absorbance of DOX at 480 nm was measured and a calibration curve using free DOX (concentration range from 0 to 40 µM, Supplementary Figure S1b) was used to finally quantify the amount of encapsulated DOX. Samples were taken from the reaction mixture at the indicated times and were subjected to size exclusion filtration through PD-10 desalting columns to capture the free doxorubicin. The flow through fractions containing the liposomes were collected and lysed in PBS containing 1% Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MS, U.S.) to disrupt the lipid bilayer and release the entrapped DOX. Absorbance at 480 nm of each fraction was measured. As a negative control, the encapsulation process was also carried out with classic LUV (containing PBS instead of AS) in parallel.

Once the feasibility and efficiency of DOX encapsulation inside LUV-AS (LUVDOX) was proven, the next step was to attach sTRAIL on their surface. For that, sTRAIL was incubated with LD at the same protein/lipid ratio as in the classic LT [37] to obtain the LDT formulation. Since sTRAIL was coupled to LD incubating at 15 °C to diminish a possible DOX leakage, instead of 37 °C, as in the case of classic LT formulation, the efficiency of the TRAIL attachment process was checked to discard a possible low-binding efficiency. For that, LDT were ultra-centrifuged at 60,000 rpm for 5 hours, and the presence of uncoupled 25 kD as TRAIL in the supernatant was assessed by Western blot (Supplementary Figure S1e). The coupling efficiency was very high and similar to that of classic LT [57], validating the modification of the protocol. Therefore, the final concentration of DOX and TRAIL in the stock of LDT was 775 µM and 12 µg/mL, respectively.

4.2. Cell Culture

A549 (derived from non-small cell lung carcinoma), HT-29 (derived from colon adenocarcinoma), RAJI (derived from Burkitt's lymphoma), U937 (derived from histiocytic lymphoma), MOLT4 (derived from T-cell acute lymphoblastic leukemia), A673 (derived from Ewing's sarcoma), HT-1080 (derived from fibrosarcoma), and RD cells (derived from rhabdomyosarcoma) cell lines were obtained from ATCC. Cell lines were routinely cultured at 37 °C with 5% CO₂ in DMEM medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, and penicillin/streptomycin (hereafter, complete medium).

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from whole peripheral blood samples from healthy donors by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque[®] (GE Healthcare). T-cell blasts were generated by stimulating PBMC (2 × 10⁶ cells/mL) with 5 µg/mL PHA (phytohemagglutinin) for 1 day. Then, PHA was removed, and cells were resuspended in complete medium supplemented with 30 UI/mL IL-2 and cultured for 6 days changing medium every 48 h.

4.3. Cytotoxicity Assays and Apoptosis Quantification

Tumor cell lines (3×10^4 cells) were treated with LT and LDT for 24 hours at the following concentrations: 1, 4, 12, 37, 111, 333, and 1000 ng/mL of TRAIL, which corresponded to the following concentrations of DOX: 0.09, 0.27, 0.8, 2.39, 7.17, 21.52, and 64.56 μ M, respectively. Dose-response experiments were also performed using LDT with the same concentration of TRAIL, but with a concentration of DOX 10 times less than those previously indicated (LDT 1/10). LUV-type liposomes without TRAIL anchored to their surface but loaded with DOX (LD and LD 1/10) with the previously described doses were also used in cytotoxicity assays. Time-course experiments were also carried out incubating the epithelial-derived cancer cell lines A549, SKBR3, and HT-29 and the sarcoma cell lines A673, HT-1080, and RD with 1000 ng/mL of LT, LD, and LDT for 1, 2, 4, and 6 hours. Times of incubation at 8 and 20 hours were also included for sarcoma cells. Experiments of apoptosis inhibition assays were carried out by pre-incubating cells with the blocking anti-human TRAIL mAb (500 ng/mL, clone RIK2, BD Biosciences), with the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk (30 μ M, Bachem, Bubendorf BL, Switzerland) or with the specific caspase-9 inhibitor IETD-fmk (30 μ M, Bachem) for 1 hour prior to the addition of LT or LDT. Finally, apoptosis induced by different liposome formulations was analyzed by annexin-V staining using a FACSCalibur flow cytometer and CellQuest software (BD Biosciences).

4.4. Scanning Electron Microscopy

Samples of LDT for analysis by SEM were prepared as previously described [57]. Briefly, after adding glutaraldehyde to bare LDT suspensions up to a final concentration of 1%, a drop was placed onto a glass microscope slide previously treated with 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma). Then, the sample was washed with PBS, fixed with 1% OsO₄, and washed again with PBS. Thereafter, the sample was dehydrated in a graded series of ethanol (25%–100%), mounted on specimen, and coated with gold. Finally, the sample was analyzed using a Hitachi S-3400 N scanning electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan).

4.5. Western Blot Analysis

Western blot was performed for protein expression analysis, as previously described [47–49]. The antibodies used to analyze the expression of the main proteins involved in the apoptotic pathway were: anti-caspase-8 (BD Biosciences), anti-caspase-3 (Cell Signaling), anti-Bid (BD Biosciences), anti-PARP-1 (BD Biosciences), and anti-caspase-9 (MBL). The expression of β -actin was analyzed as loading control, using a specific antibody (Sigma). Western blot was also carried out to assess the binding of TRAIL to LD using the anti-TRAIL antibody RIK2 (eBiosciences).

For Western blot analysis, cells (5×10^6) were lysed at 4 °C with 100 μ L of a buffer containing 1% Triton X-100 and protease and phosphatase inhibitors, as previously described [46–49]. Then, protein from lysed cells were separated by 12% SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and blocked with TBS-T buffer (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 0.12 M NaCl, 0.1% Tween-20, 0.05% sodium azide) containing 5% skimmed milk. PVDF membranes were incubated with the above-mentioned antibodies in TBS-T containing 2% skimmed milk. After that, PVDF membranes were washed with TBS-T, incubated with 0.2 μ g/mL of peroxidase-labeled or phosphatase alkaline-labeled secondary antibody (Sigma), and revealed with the corresponding substrate Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, Waltham, MA, U.S.) or CDP-Star (Merck, Kenilworth, New Jersey, U.S.), respectively.

4.6. Fluorescence Microscopy Analysis

Analysis of the intracellular location of liposome formulation were performed by fluorescence microscopy. For that, A549 cells were pre-treated for 1 h with Lysotracker™ green (ThermoFisher). Then, cells were treated with LD or LDT at their maximum working concentrations (1000 ng/mL TRAIL; 64.56 μ M DOX) for 1 hour. At the final time, medium was carefully replaced, and cells were cooled for 10 min at 4 °C. Finally, green fluorescence corresponding to lysosomal compartment and red

fluorescence corresponding to DOX were photographed using a fluorescence microscopy (E600/E400, Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a digital photograph system (DXM 1200F, Nikon).

4.7. Confocal Fluorescence Microscopy Analysis

For analysis of LD and LDT by confocal microscopy, A549 cells were seeded in 8-well chamber slides (Labtek®, 20×10^4 cells per condition). The following day, cells were treated for the indicated times with LD or LDT. At the end of the treatment, slides were quickly washed with cold PBS and fixed in PFA 4% for 30 minutes at room temperature in the dark. Next, cells were blocked with PBS 5% FCS, and then they were stained overnight with an anti-LAMP1 antibody (Cell Signaling). The following day, cells were washed and incubated with an Alexa 488 secondary antibody. Finally, cells were washed, and mounted onto drops of Fluoromount-G (Southern Biotech) containing DAPI. Fluorescence images were taken using a confocal microscopy (Olympus FV10i). Data was analyzed using a FV10-ASW Viewer, v3.1 (Olympus).

4.8. Study of the Internalization Mechanism

To analyze the endocytic pathways involved in LT-induced signaling, Dynasore (DYN, Sigma), a small molecule GTPase inhibitor that targets dynamin-1, -2, and Drp1, was used [61]. The cell lines A549, HT-29, and SKBR3 were incubated in the presence or absence of DYN (80 μ M) for 1 hour. After that, cells were treated with LD or LDT at 1000 ng/mL for 3 hours. Experiments pre-incubating cells with the caspase-8 inhibitor z-IETD-fmk (30 μ M) for 1 hour prior to addition of liposome formulations were also performed. Finally, apoptosis was quantified by annexin-V staining. Doxorubicin uptake was measured quantifying the mean fluorescence intensity (MFI) at the FL3 channel (red fluorescence). Both annexin-V staining and DOX MFI were analyzed using a FACSCalibur flow cytometer and CellQuest software (BD Biosciences).

4.9. In Vivo Study of Toxicity

Immune-deficient athymic mice, Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu}, six-week-old females (Janvier), were used to evaluate *in vivo* toxicity. All experiments in mice were carried out according to the European recommendations on animal ethics and were approved by the University of Zaragoza Animal Experimentation Ethical Committee (PI 18/16).

In order to assess the toxicity of LDT, five animals were systemically injected with 36 μ g of LDT 1/10 4 times with an interval of 2 days between each injection. Control mice (2 animals) were injected with PBS. After 2 weeks, mice were sacrificed and blood was collected by heart puncture, and serum was obtained from them by centrifugation and stored at -20°C until analysis. Aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) serum levels were determined as previously described [48,57]. At the same time, mice were sacrificed, and liver, kidney, spleen, and ovaries were surgically dissected and fixed in 10% buffered formalin. After fixation for three days, tissues were embedded in paraffin and sectioned in 5 μ m sections. The slides were then deparaffined in xylene, dehydrated in a gradient of alcohols, and stained using hematoxylin and eosin (H and E).

4.10. In Vivo Anti-Tumor Activity

Same immune-deficient athymic mice as above mentioned (Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu}, six-week old females), were used to evaluate *in vivo* antitumor activity. As previously mentioned, all experiments in mice were performed following the European recommendations on animal ethics and were approved by the University of Zaragoza Animal Experimentation Ethical Committee (PI 18/16). Mice were kept under specific standard pathogen-free conditions throughout the study.

Freshly harvested H-1080 cells (5×10^6 cells/mouse) were inoculated subcutaneously into mice. Once tumors reached a volume of 100 mm³, mice were randomly divided in 3 groups: Control (4 mice), LT (6 mice), and LDT (6 mice). 36 μ g of TRAIL as LT or LDT 1/10, in a total volume of 200 μ L, were injected intra-peritoneally daily during 4 consecutive days. The Control group were injected with

sterile PBS. Tumors were left to grow until they reached 1000 mm³ or when clinical signs required euthanasia. During all of the experiments, tumor volumes were monitored daily, and tumor volume was calculated using the following formula: tumor volume = L × W × H (where L is length, W is width, and H is the height dimensions of the tumor, respectively).

4.11. Statistical Analysis

Computer-based statistical analysis was carried out using the Prism[®] software program (GraphPad Software, San Diego, CA, U.S.). All values are expressed as mean ± standard deviation (SD) of at least 3 experiments. Statistical significance was analyzed by using Student's *t*-test. A *p* < 0.05 was considered statistically significant.

5. Conclusions

Doxorubicin (DOX) has been widely described to synergize with sTRAIL when administered in combination. In this line, nanoparticles combining both molecules have already been developed [38,74–77]. Consequently, the generation of a unique formulation that includes both anti-cancer drugs, such as LUVDOX-TRAIL, could be of great interest to treat different types of cancer. Our liposomal formulation shows a cytotoxic potential and a synergy never observed in any TRAIL and DOX combination before. In summary, LDT exerted an enhanced anti-tumor effect not only in vitro but also in vivo without overt adverse effects and could potentially be clinically relevant to improve anti-tumor therapy against TRAIL-resistant cancers.

6. Patents

Alberto Anel and Luis Martinez-Lostao have filed a patent application (W02011020933) for the use of liposome-bound Apo2L/TRAIL.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/11/12/1948/s1>, Figure S1: Cytotoxicity of soluble TRAIL on a panel of tumor cell lines from distinct origin, Figure S2: Cytotoxicity of LUV-DOXTRAIL on HCT-116 Bax^{-/-}-shBak, RH4 cells and SKBR3 siCASP8 cells, Figure S3: Cytotoxicity of LUVDOX-TRAIL 1/10 on peripheral blood mononuclear cells and T-cell blasts.

Author Contributions: Conceptualization, D.D.M., A.A. and L.M.-L.; Methodology, D.D.M., A.G.-L., M.M.-A. and J.P.; Formal analysis, D.D.M., A.G.-L., M.M.-A. and J.P.; Investigation, D.D.M., A.G.-L., M.M.-A. and J.P.; Data Curation, D.D.M. and A.G.-L.; Writing—original draft preparation, L.M.-L.; Writing—review and editing, D.D.M., L.M.-L. and A.A.; Visualization, L.M.-L.; Supervision, L.M.-L. and A.A.; Project administration, L.M.-L.; Funding acquisition, L.M.-L.

Funding: This study has been founded by Instituto de Salud Carlos III through the project PI16/00526 (LML) (Co-funded by European Regional Development Fund/European Social Fund, “Investing in your future”). A.G.-L. was supported by a pre-doctoral fellowship from Gobierno de Aragón.

Acknowledgments: We gratefully acknowledge Angel Millán for support in the electron microscopy experiments. We also gratefully acknowledge Henning Walczak for support throughout the years.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Pitti, R.M.; Marsters, S.A.; Ruppert, S.; Donahue, C.J.; Moore, A.; Ashkenazi, A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 12687–12690. [CrossRef] [PubMed]
2. Wiley, S.R.; Schooley, K.; Smolak, P.J.; Din, W.S.; Huang, C.P.; Nicholl, J.K.; Sutherland, G.R.; Smith, T.D.; Rauch, C.; Smith, C.A.; et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* **1995**, *3*, 673–682. [CrossRef]
3. Walczak, H.; Miller, R.E.; Ariail, K.; Gliniak, B.; Griffith, T.S.; Kubin, M.; Chin, W.; Jones, J.; Woodward, A.; Le, T.; et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 157–163. [CrossRef] [PubMed]

4. Ashkenazi, A. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 1001–1012. [[CrossRef](#)]
5. Johnstone, R.W.; Frew, A.J.; Smyth, M.J. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 782–798. [[CrossRef](#)]
6. von Karstedt, S.; Montinaro, A.; Walczak, H. Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 352–366. [[CrossRef](#)]
7. Lemke, J.; von Karstedt, S.; Zinngrebe, J.; Walczak, H. Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell Death Differ.* **2014**, *21*, 1350–1364. [[CrossRef](#)]
8. Micheau, O.; Shirley, S.; Dufour, F. Death receptors as targets in cancer. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *169*, 1723–1744. [[CrossRef](#)]
9. Palacios, C.; Yerbés, R.; Sanchez-Perez, T.; Martin-Perez, R.; Cano-Gonzalez, A.; Lopez-Rivas, A. The long and winding road to cancer treatment: The TRAIL system. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*, 2819–2833. [[CrossRef](#)]
10. Bernardi, S.; Secchiero, P.; Zauli, G. State of art and recent developments of anti-cancer strategies based on TRAIL. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* **2012**, *7*, 207–217. [[CrossRef](#)]
11. den Hollander, M.W.; Gietema, J.A.; de Jong, S.; Walenkamp, A.M.; Reyners, A.K.; Oldenhuis, C.N.; de Vries, E.G. Translating TRAIL-receptor targeting agents to the clinic. *Cancer Lett.* **2013**, *332*, 194–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Dimberg, L.Y.; Anderson, C.K.; Camidge, R.; Behbakht, K.; Thorburn, A.; Ford, H.L. On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics. *Oncogene* **2013**, *32*, 1341–1350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Lim, B.; Allen, J.E.; Prabhu, V.V.; Talekar, M.K.; Finnberg, N.K.; El-Deiry, W.S. Targeting TRAIL in the treatment of cancer: New developments. *Expert Opin. Ther. Targets* **2015**, *19*, 1171–1185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Balsas, P.; Lopez-Royuela, N.; Galan-Malo, P.; Anel, A.; Marzo, I.; Naval, J. Cooperation between Apo2L/TRAIL and bortezomib in multiple myeloma apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *77*, 804–812. [[CrossRef](#)]
15. Palacios, C.; Yerbés, R.; Lopez-Rivas, A. Flavopiridol induces cellular FLICE-inhibitory protein degradation by the proteasome and promotes TRAIL-induced early signaling and apoptosis in breast tumor cells. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 8858–8869. [[CrossRef](#)]
16. Frew, A.J.; Lindemann, R.K.; Martin, B.P.; Clarke, C.J.; Sharkey, J.; Anthony, D.A.; Banks, K.M.; Haynes, N.M.; Gangatirkar, P.; Stanley, K.; et al. Combination therapy of established cancer using a histone deacetylase inhibitor and a TRAIL receptor agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 11317–11322. [[CrossRef](#)]
17. Psahoulia, F.H.; Drosopoulos, K.G.; Doubravska, L.; Andera, L.; Pintzas, A. Quercetin enhances TRAIL-mediated apoptosis in colon cancer cells by inducing the accumulation of death receptors in lipid rafts. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 2591–2599. [[CrossRef](#)]
18. Sun, X.; Pang, Z.; Ye, H.; Qiu, B.; Guo, L.; Li, J.; Ren, J.; Qian, Y.; Zhang, Q.; Chen, J.; et al. Co-delivery of pEGFP-hTRAIL and paclitaxel to brain glioma mediated by an angiopep-conjugated liposome. *Biomaterials* **2012**, *33*, 916–924. [[CrossRef](#)]
19. Guo, L.; Fan, L.; Ren, J.; Pang, Z.; Ren, Y.; Li, J.; Wen, Z.; Qian, Y.; Zhang, L.; Ma, H.; et al. Combination of TRAIL and actinomycin D liposomes enhances antitumor effect in non-small cell lung cancer. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 1449–1460.
20. Cuello, M.; Ettenberg, S.A.; Nau, M.M.; Lipkowitz, S. Synergistic induction of apoptosis by the combination of trail and chemotherapy in chemoresistant ovarian cancer cells. *Gynecol. Oncol.* **2001**, *81*, 380–390. [[CrossRef](#)]
21. De Miguel, D.; Lemke, J.; Anel, A.; Walczak, H.; Martinez-Lostao, L. Onto better TRAILs for cancer treatment. *Cell Death Differ.* **2016**, *23*, 733–747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Guimaraes, P.P.G.; Gaglione, S.; Sewastianik, T.; Carrasco, R.D.; Langer, R.; Mitchell, M.J. Nanoparticles for Immune Cytokine TRAIL-Based Cancer Therapy. *ACS Nano* **2018**, *12*, 912–931. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Stuckey, D.W.; Shah, K. TRAIL on trial: Preclinical advances in cancer therapy. *Trends Mol. Med.* **2013**, *19*, 685–694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Wajant, H.; Gerspach, J.; Pfizenmaier, K. Engineering death receptor ligands for cancer therapy. *Cancer Lett.* **2013**, *332*, 163–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Zakaria, A.B.; Picaud, F.; Rattier, T.; Pudlo, M.; Dufour, F.; Saviot, L.; Chassagnon, R.; Lherminier, J.; Gharbi, T.; Micheau, O.; et al. Nanovectorization of TRAIL with single wall carbon nanotubes enhances tumor cell killing. *Nano Lett.* **2015**, *15*, 891–895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Wu, X.; Wang, S.; Li, M.; Wang, A.; Zhou, Y.; Li, P.; Wang, Y. Nanocarriers for TRAIL delivery: Driving TRAIL back on track for cancer therapy. *Nanoscale* **2017**, *9*, 13879–13904. [[CrossRef](#)]
27. Berg, D.; Lehne, M.; Muller, N.; Siegmund, D.; Munkel, S.; Sebald, W.; Pfizenmaier, K.; Wajant, H. Enforced covalent trimerization increases the activity of the TNF ligand family members TRAIL and CD95L. *Cell Death Differ.* **2007**, *14*, 2021–2034. [[CrossRef](#)]
28. de Bruyn, M.; Rybczynska, A.A.; Wei, Y.; Schwenkert, M.; Fey, G.H.; Dierckx, R.A.; van Waarde, A.; Helfrich, W.; Bremer, E. Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan (MCSP)-targeted delivery of soluble TRAIL potently inhibits melanoma outgrowth in vitro and in vivo. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 301. [[CrossRef](#)]
29. Siegmund, M.; Pollak, N.; Seifert, O.; Wahl, K.; Hanak, K.; Vogel, A.; Nussler, A.K.; Gottsch, D.; Munkel, S.; Bantel, H.; et al. Superior antitumoral activity of dimerized targeted single-chain TRAIL fusion proteins under retention of tumor selectivity. *Cell Death Dis.* **2012**, *3*, e295. [[CrossRef](#)]
30. Bremer, E.; van Dam, G.M.; de Bruyn, M.; van Riezen, M.; Dijkstra, M.; Kamps, G.; Helfrich, W.; Haisma, H. Potent systemic anticancer activity of adenovirally expressed EGFR-selective TRAIL fusion protein. *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 1919–1926. [[CrossRef](#)]
31. Ten Cate, B.; Bremer, E.; de Bruyn, M.; Bijma, T.; Samplonius, D.; Schwemmler, M.; Huls, G.; Fey, G.; Helfrich, W. A novel AML-selective TRAIL fusion protein that is superior to Gemtuzumab Ozogamicin in terms of in vitro selectivity, activity and stability. *Leukemia* **2009**, *23*, 1389–1397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. de Bruyn, M.; Wei, Y.; Wiersma, V.R.; Samplonius, D.F.; Klip, H.G.; van der Zee, A.G.; Yang, B.; Helfrich, W.; Bremer, E. Cell surface delivery of TRAIL strongly augments the tumoricidal activity of T cells. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 5626–5637. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. El-Mesery, M.; Trebing, J.; Schafer, V.; Weisenberger, D.; Siegmund, D.; Wajant, H. CD40-directed scFv-TRAIL fusion proteins induce CD40-restricted tumor cell death and activate dendritic cells. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e916. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Gasparian, M.E.; Bychkov, M.L.; Yagolovich, A.V.; Dolgikh, D.A.; Kirpichnikov, M.P. Mutations Enhancing Selectivity of Antitumor Cytokine TRAIL to DR5 Receptor Increase Its Cytotoxicity against Tumor Cells. *Biochemistry* **2015**, *80*, 1080–1091. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Huang, M.; Zhu, H.; Yi, C.; Yan, J.; Wei, L.; Yang, X.; Chen, S.; Huang, Y. A novel TRAIL mutant-TRAIL-Mu3 enhances the antitumor effects by the increased affinity and the up-expression of DR5 in pancreatic cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2018**, *82*, 829–838. [[CrossRef](#)]
36. Chae, S.Y.; Kim, T.H.; Park, K.; Jin, C.H.; Son, S.; Lee, S.; Youn, Y.S.; Kim, K.; Jo, D.G.; Kwon, I.C.; et al. Improved antitumor activity and tumor targeting of NH(2)-terminal-specific PEGylated tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Mol. Cancer Ther.* **2010**, *9*, 1719–1729. [[CrossRef](#)]
37. De Miguel, D.; Basanez, G.; Sanchez, D.; Malo, P.G.; Marzo, I.; Larrad, L.; Naval, J.; Pardo, J.; Anel, A.; Martinez-Lostao, L. Liposomes decorated with Apo2L/TRAIL overcome chemoresistance of human hematologic tumor cells. *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 893–904. [[CrossRef](#)]
38. Guo, L.; Fan, L.; Pang, Z.; Ren, J.; Ren, Y.; Li, J.; Chen, J.; Wen, Z.; Jiang, X. TRAIL and doxorubicin combination enhances anti-glioblastoma effect based on passive tumor targeting of liposomes. *J. Control. Release* **2011**, *154*, 93–102. [[CrossRef](#)]
39. Perlstein, B.; Finniss, S.A.; Miller, C.; Okhrimenko, H.; Kazimirsky, G.; Cazacu, S.; Lee, H.K.; Lemke, N.; Brodie, S.; Umansky, F.; et al. TRAIL conjugated to nanoparticles exhibits increased anti-tumor activities in glioma cells and glioma stem cells in vitro and in vivo. *Neuro Oncol.* **2013**, *15*, 29–40. [[CrossRef](#)]
40. Kim, T.H.; Jiang, H.H.; Youn, Y.S.; Park, C.W.; Lim, S.M.; Jin, C.H.; Tak, K.K.; Lee, H.S.; Lee, K.C. Preparation and characterization of Apo2L/TNF-related apoptosis-inducing ligand-loaded human serum albumin nanoparticles with improved stability and tumor distribution. *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100*, 482–491. [[CrossRef](#)]
41. Nair, P.M.; Flores, H.; Gogineni, A.; Marsters, S.; Lawrence, D.A.; Kelley, R.F.; Ngu, H.; Sagolla, M.; Komuves, L.; Bourgon, R.; et al. Enhancing the antitumor efficacy of a cell-surface death ligand by covalent membrane display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 5679–5684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Seifert, O.; Pollak, N.; Nusser, A.; Steiniger, F.; Ruger, R.; Pfizenmaier, K.; Kontermann, R.E. Immuno-LipoTRAIL: Targeted delivery of TRAIL-functionalized liposomal nanoparticles. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 879–887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

43. Martinez-Lorenzo, M.J.; Anel, A.; Gamen, S.; Monleon, I.; Lasiererra, P.; Larrad, L.; Pineiro, A.; Alava, M.A.; Naval, J. Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *J. Immunol.* **1999**, *163*, 1274–1281. [[PubMed](#)]
44. Monleon, I.; Martinez-Lorenzo, M.J.; Monteagudo, L.; Lasiererra, P.; Taules, M.; Iturralde, M.; Pineiro, A.; Larrad, L.; Alava, M.A.; Naval, J.; et al. Differential secretion of Fas ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 6736–6744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. De Miguel, D.; Gallego-Lleyda, A.; Anel, A.; Martinez-Lostao, L. Liposome-bound TRAIL induces superior DR5 clustering and enhanced DISC recruitment in histiocytic lymphoma U937 cells. *Leuk. Res.* **2015**, *39*, 657–666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. De Miguel, D.; Gallego-Lleyda, A.; Galan-Malo, P.; Rodriguez-Vigil, C.; Marzo, I.; Anel, A.; Martinez-Lostao, L. Immunotherapy with liposome-bound TRAIL overcome partial protection to soluble TRAIL-induced apoptosis offered by down-regulation of Bim in leukemic cells. *Clin. Transl. Oncol.* **2015**, *17*, 657–667. [[CrossRef](#)]
47. De Miguel, D.; Gallego-Lleyda, A.; Ayuso, J.M.; Erviti-Ardanaz, S.; Pazo-Cid, R.; del Agua, C.; Fernandez, L.J.; Ochoa, I.; Anel, A.; Martinez-Lostao, L. TRAIL-coated lipid-nanoparticles overcome resistance to soluble recombinant TRAIL in non-small cell lung cancer cells. *Nanotechnology* **2016**, *27*, 185101. [[CrossRef](#)]
48. De Miguel, D.; Gallego-Lleyda, A.; Ayuso, J.M.; Pawlak, A.; Conde, B.; Ochoa, I.; Fernandez, L.J.; Anel, A.; Martinez-Lostao, L. Improved Anti-Tumor Activity of Novel Highly Bioactive Liposome-Bound TRAIL in Breast Cancer Cells. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* **2016**, *11*, 197–214. [[CrossRef](#)]
49. De Miguel, D.; Gallego-Lleyda, A.; Ayuso, J.M.; Pejenaute-Ochoa, D.; Jarauta, V.; Marzo, I.; Fernandez, L.J.; Ochoa, I.; Conde, B.; Anel, A.; et al. High-order TRAIL oligomer formation in TRAIL-coated lipid nanoparticles enhances DR5 cross-linking and increases antitumour effect against colon cancer. *Cancer Lett.* **2016**, *383*, 250–260. [[CrossRef](#)]
50. Gabizon, A.A.; Patil, Y.; La-Beck, N.M. New insights and evolving role of pegylated liposomal doxorubicin in cancer therapy. *Drug Resist Updat.* **2016**, *29*, 90–106. [[CrossRef](#)]
51. Zhao, Z.; Ukidve, A.; Gao, Y.; Kim, J.; Mitragotri, S. Erythrocyte leveraged chemotherapy (ELeCt): Nanoparticle assembly on erythrocyte surface to combat lung metastasis. *Sci. Adv.* **2019**, *5*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Wang, S.; Ren, W.; Liu, J.; Lahat, G.; Torres, K.; Lopez, G.; Lazar, A.J.; Hayes-Jordan, A.; Liu, K.; Bankson, J.; et al. TRAIL and doxorubicin combination induces proapoptotic and antiangiogenic effects in soft tissue sarcoma in vivo. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 2591–2604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Dumitru, C.A.; Carpinteiro, A.; Trarbach, T.; Hengge, U.R.; Gulbins, E. Doxorubicin enhances TRAIL-induced cell death via ceramide-enriched membrane platforms. *Apoptosis* **2007**, *12*, 1533–1541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Kelly, M.M.; Hoel, B.D.; Voelkel-Johnson, C. Doxorubicin pretreatment sensitizes prostate cancer cell lines to TRAIL induced apoptosis which correlates with the loss of c-FLIP expression. *Cancer Biol. Ther.* **2002**, *1*, 520–527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Lee, A.L.; Dhillon, S.H.; Wang, Y.; Pervaiz, S.; Fan, W.; Yang, Y.Y. Synergistic anti-cancer effects via co-delivery of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo2L) and doxorubicin using micellar nanoparticles. *Mol. Biosyst.* **2011**, *7*, 1512–1522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Barenholz, Y. Doxil(R)—The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J. Control Release* **2012**, *160*, 117–134. [[CrossRef](#)]
57. Martinez-Lostao, L.; Garcia-Alvarez, F.; Basanez, G.; Alegre-Aguaron, E.; Desportes, P.; Larrad, L.; Naval, J.; Jose Martinez-Lorenzo, M.; Anel, A. Liposome-bound APO2L/TRAIL is an effective treatment in a rheumatoid arthritis model. *Arthritis Rheum* **2010**, *62*, 2272–2282. [[CrossRef](#)]
58. Gallego-Lleyda, A.; De Miguel, D.; Anel, A.; Martinez-Lostao, L. Lipid Nanoparticles Decorated with TNF-Related Aptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Are More Cytotoxic than Soluble Recombinant TRAIL in Sarcoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1449. [[CrossRef](#)]
59. Kang, Z.; Chen, J.J.; Yu, Y.; Li, B.; Sun, S.Y.; Zhang, B.; Cao, L. Drozitumab, a human antibody to death receptor 5, has potent antitumor activity against rhabdomyosarcoma with the expression of caspase-8 predictive of response. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 3181–3192. [[CrossRef](#)]

60. Seynhaeve, A.L.B.; Dicheva, B.M.; Hoving, S.; Koning, G.A.; Ten Hagen, T.L.M. Intact Doxil is taken up intracellularly and released doxorubicin sequesters in the lysosome: Evaluated by in vitro/in vivo live cell imaging. *J. Control Release* **2013**, *172*, 330–340. [[CrossRef](#)]
61. Kirchhausen, T.; Macia, E.; Pelish, H.E. Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis. *Methods Enzymol.* **2008**, *438*, 77–93. [[PubMed](#)]
62. Lawrence, D.; Shahrokh, Z.; Marsters, S.; Achilles, K.; Shih, D.; Mounho, B.; Hillan, K.; Totpal, K.; DeForge, L.; Schow, P.; et al. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 383–385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Keane, M.M.; Ettenberg, S.A.; Nau, M.M.; Russell, E.K.; Lipkowitz, S. Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 734–741. [[PubMed](#)]
64. Vaculova, A.; Kaminsky, V.; Jalalvand, E.; Surova, O.; Zhivotovsky, B. Doxorubicin and etoposide sensitize small cell lung carcinoma cells expressing caspase-8 to TRAIL. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 87. [[CrossRef](#)]
65. Akazawa, Y.; Mott, J.L.; Bronk, S.F.; Werneburg, N.W.; Kahraman, A.; Guicciardi, M.E.; Meng, X.W.; Kohno, S.; Shah, V.H.; Kaufmann, S.H.; et al. Death receptor 5 internalization is required for lysosomal permeabilization by TRAIL in malignant liver cell lines. *Gastroenterology* **2009**, *136*, 2365–2376. [[CrossRef](#)]
66. Werneburg, N.W.; Guicciardi, M.E.; Bronk, S.F.; Kaufmann, S.H.; Gores, G.J. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand activates a lysosomal pathway of apoptosis that is regulated by Bcl-2 proteins. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 28960–28970. [[CrossRef](#)]
67. Guicciardi, M.E.; Bronk, S.F.; Werneburg, N.W.; Gores, G.J. cFLIPL prevents TRAIL-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the lysosomal pathway of apoptosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2007**, *292*, G1337–G1346. [[CrossRef](#)]
68. Bosque, A.; Pardo, J.; Martinez-Lorenzo, M.J.; Iturralde, M.; Marzo, I.; Pineiro, A.; Alava, M.A.; Naval, J.; Anel, A. Down-regulation of normal human T cell blast activation: Roles of APO2L/TRAIL, FasL, and c-FLIP, Bim, or Bcl-x isoform expression. *J. Leukoc. Biol.* **2005**, *77*, 568–578. [[CrossRef](#)]
69. Ashkenazi, A.; Pai, R.C.; Fong, S.; Leung, S.; Lawrence, D.A.; Marsters, S.A.; Blackie, C.; Chang, L.; McMurtrey, A.E.; Hebert, A.; et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J. Clin. Invest.* **1999**, *104*, 155–162. [[CrossRef](#)]
70. Ganten, T.M.; Koschny, R.; Sykora, J.; Schulze-Bergkamen, H.; Buchler, P.; Haas, T.L.; Schader, M.B.; Untergasser, A.; Stremmel, W.; Walczak, H. Preclinical differentiation between apparently safe and potentially hepatotoxic applications of TRAIL either alone or in combination with chemotherapeutic drugs. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 2640–2646. [[CrossRef](#)]
71. MacFarlane, M.; Ahmad, M.; Srinivasula, S.M.; Fernandes-Alnemri, T.; Cohen, G.M.; Alnemri, E.S. Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 25417–25420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Abraham, S.A.; Waterhouse, D.N.; Mayer, L.D.; Cullis, P.R.; Madden, T.D.; Bally, M.B. The liposomal formulation of doxorubicin. *Methods Enzymol.* **2005**, *391*, 71–97. [[PubMed](#)]
73. Haran, G.; Cohen, R.; Bar, L.K.; Barenholz, Y. Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1151*, 201–215. [[CrossRef](#)]
74. Bae, S.; Ma, K.; Kim, T.H.; Lee, E.S.; Oh, K.T.; Park, E.S.; Lee, K.C.; Youn, Y.S. Doxorubicin-loaded human serum albumin nanoparticles surface-modified with TNF-related apoptosis-inducing ligand and transferrin for targeting multiple tumor types. *Biomaterials* **2012**, *33*, 1536–1546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Guo, L.; Fan, L.; Ren, J.; Pang, Z.; Ren, Y.; Li, J.; Wen, Z.; Jiang, X. A novel combination of TRAIL and doxorubicin enhances antitumor effect based on passive tumor-targeting of liposomes. *Nanotechnology* **2011**, *22*, 265105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

76. Jiang, H.H.; Kim, T.H.; Lee, S.; Chen, X.; Youn, Y.S.; Lee, K.C. PEGylated TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) for effective tumor combination therapy. *Biomaterials* **2011**, *32*, 8529–8537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Thao le, Q.; Byeon, H.J.; Lee, C.; Lee, S.; Lee, E.S.; Choi, Y.W.; Choi, H.G.; Park, E.S.; Lee, K.C.; Youn, Y.S. Doxorubicin-Bound Albumin Nanoparticles Containing a TRAIL Protein for Targeted Treatment of Colon Cancer. *Pharm. Res.* **2016**, *33*, 615–626. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

