



Universidad
Zaragoza

Facultad de Ciencias

Departamento d Bioquímica y

Biología Molecular y Celular

Trabajo de Fin de Grado

ANEXO FIGURAS

**Liposomas decorados con Apo2L/TRAIL
como tratamiento antitumoral
de tumores sólidos**

Autor: Lola Pejenaute Ochoa

Director: Luis Martínez Lostao

Figura 1.

Expresión de receptores de TRAIL en células HCT-116

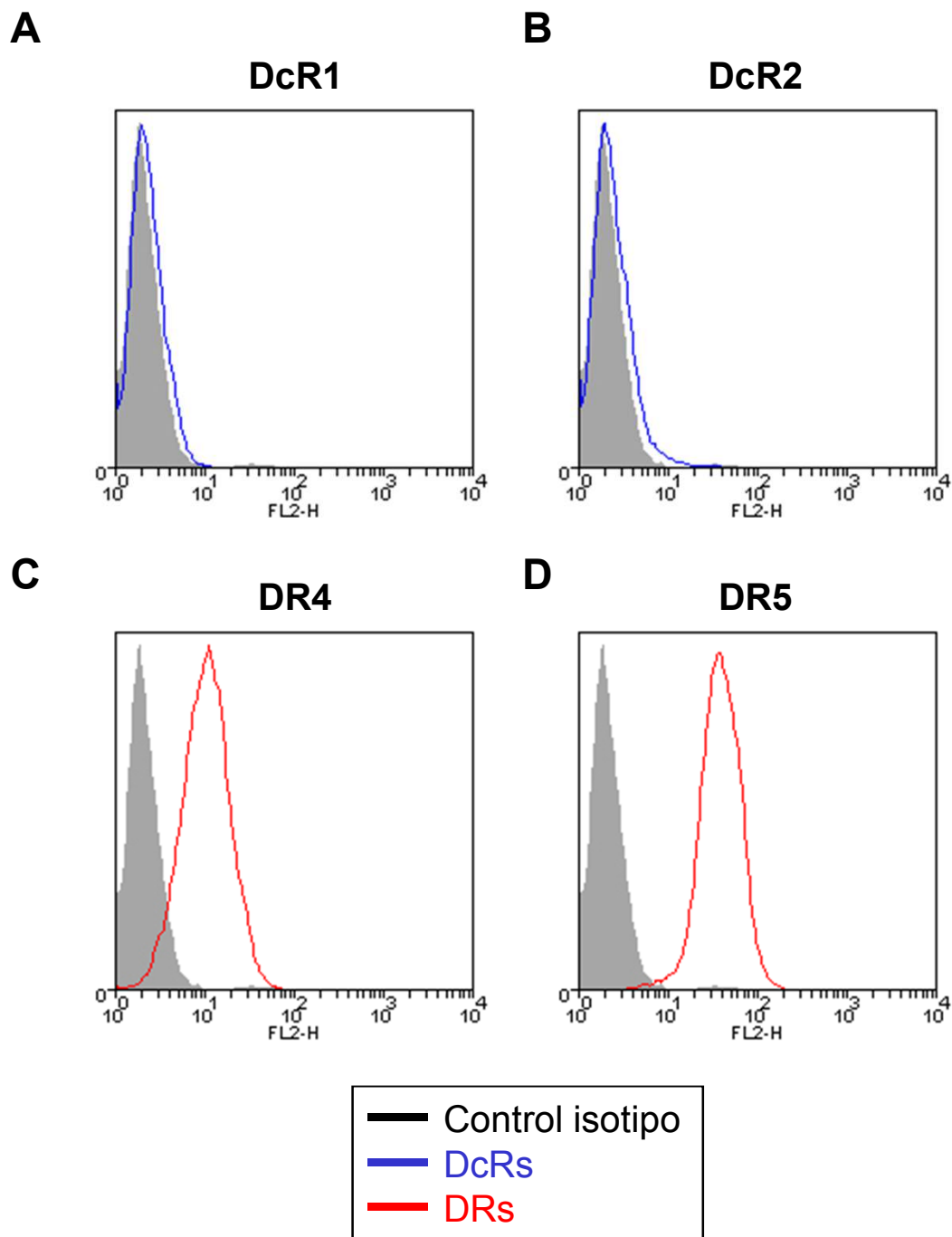


Figura 1. Expresión de los receptores de TRAIL en las células de cáncer de colon HCT-116. Se tomaron 6 muestras de 100.000 células y cada una de ellas se incubó junto con el Ac correspondiente diluido en 100 μ L de PBS con un 5% de SFB para realizar el marcaje durante 30 minutos tras lo cual se lavaron dos veces con PBS con 5% de SFB y se analizaron mediante citometría de flujo. **A)** Expresión del receptor señuelo DcR1. **B)** Expresión del receptor señuelo DcR2. **C)** Expresión del receptor pro-apoptótico DR4. **D)** Expresión del receptor pro-apoptótico DR5. El histograma gris indica el control de isotipo.

Figura 2.

Ensayos de citotoxicidad con liposomas decorados con TRAIL (LUV-TRAIL) en células HCT-116

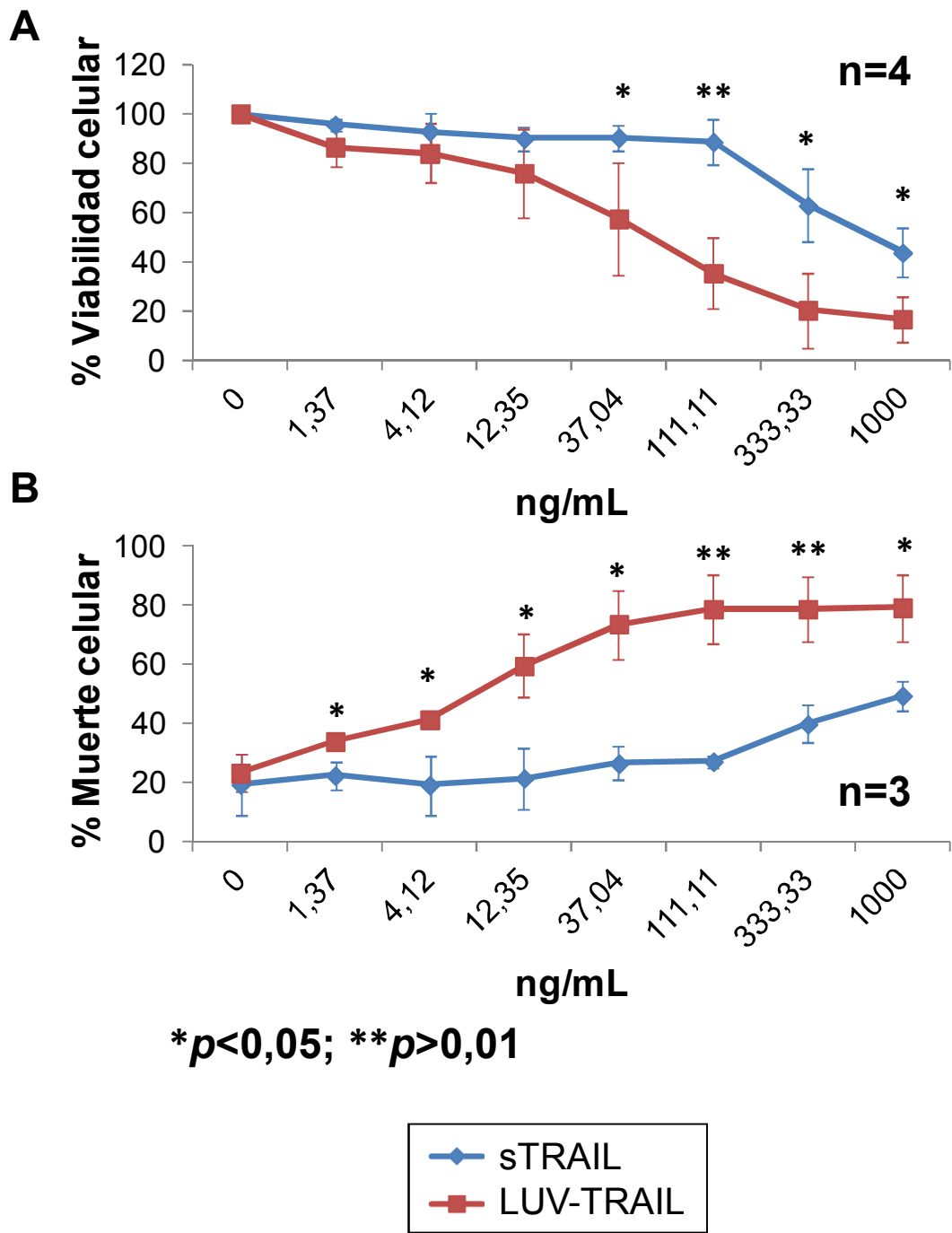


Figura 2. Ensayos de citotoxicidad con liposomas decorados con TRAIL en las células HCT-116. Se realizaron ensayos dosis-respuesta incubando las células durante 24 horas con las correspondientes dosis de TRAIL soluble (sTRAIL) y liposomas decorados con TRAIL (LUV-TRAIL). La capacidad citotóxica de ambos se analizó mediante: **A)** análisis de la disminución de la viabilidad mediante la técnica de reducción del MTT **B)** análisis de la muerte celular mediante tinción con yoduro de propidio y cuantificación mediante citometría de flujo. Las curvas representan la media de los experimentos realizados con su desviación estándar.

Figura 3.

Inhibición de la muerte celular tras el tratamiento con RIK2 en células HCT-116

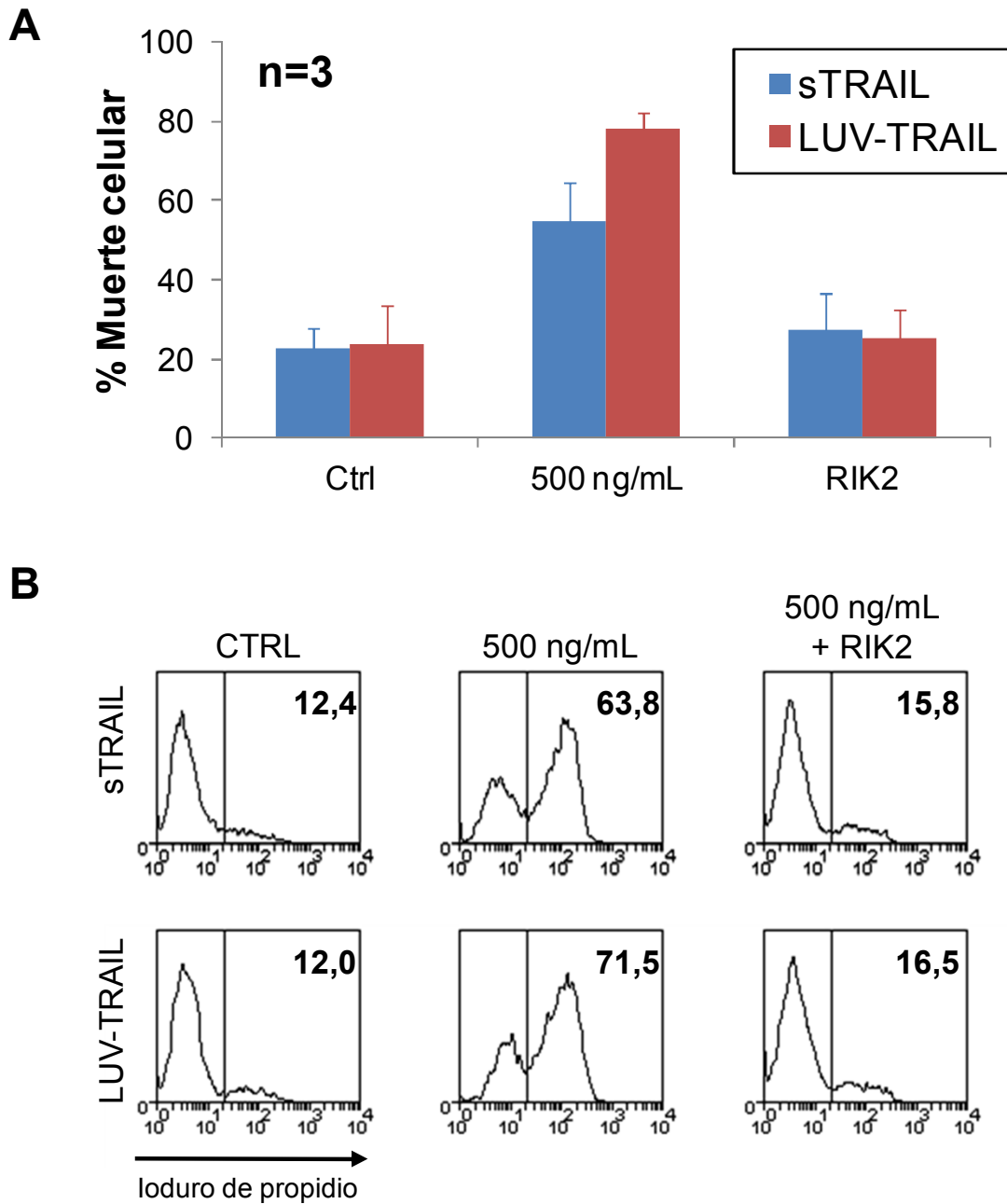


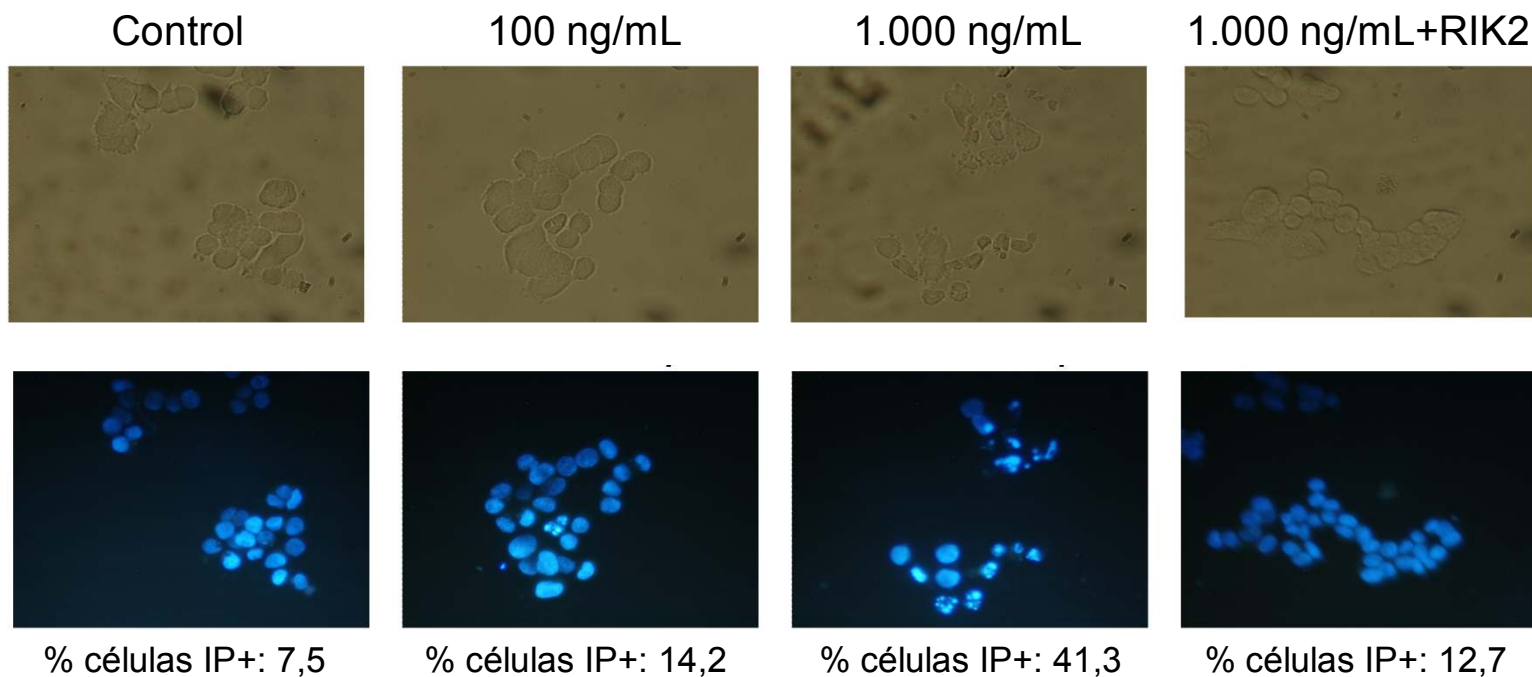
Figura 3. Inhibición de la muerte celular inducida por los LUV-TRAIL con un anticuerpo bloqueante de TRAIL en células HCT-116. Las células se pre-incubaron durante 1 hora con el anticuerpo monoclonal bloqueante de TRAIL, RIK2 a una concentración de 500 ng/mL y posteriormente se incubaron durante 24 horas con una dosis de 500 ng/mL de TRAIL soluble (sTRAIL) o liposomas decorados con TRAIL (LUV-TRAIL). La muerte celular se analizó cuantificando mediante citometría de flujo el porcentaje de células ioduro de propidio positivas. **A)** Gráfica en la que se muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos distintos. **B)** Histogramas de citometría de la tinción para ioduro de propidio de un experimento representativo.

Figura 4.

Morfología nuclear tras el tratamiento con LUV-TRAIL en células HCT-116

A

sTRAIL



B

LUV-TRAIL

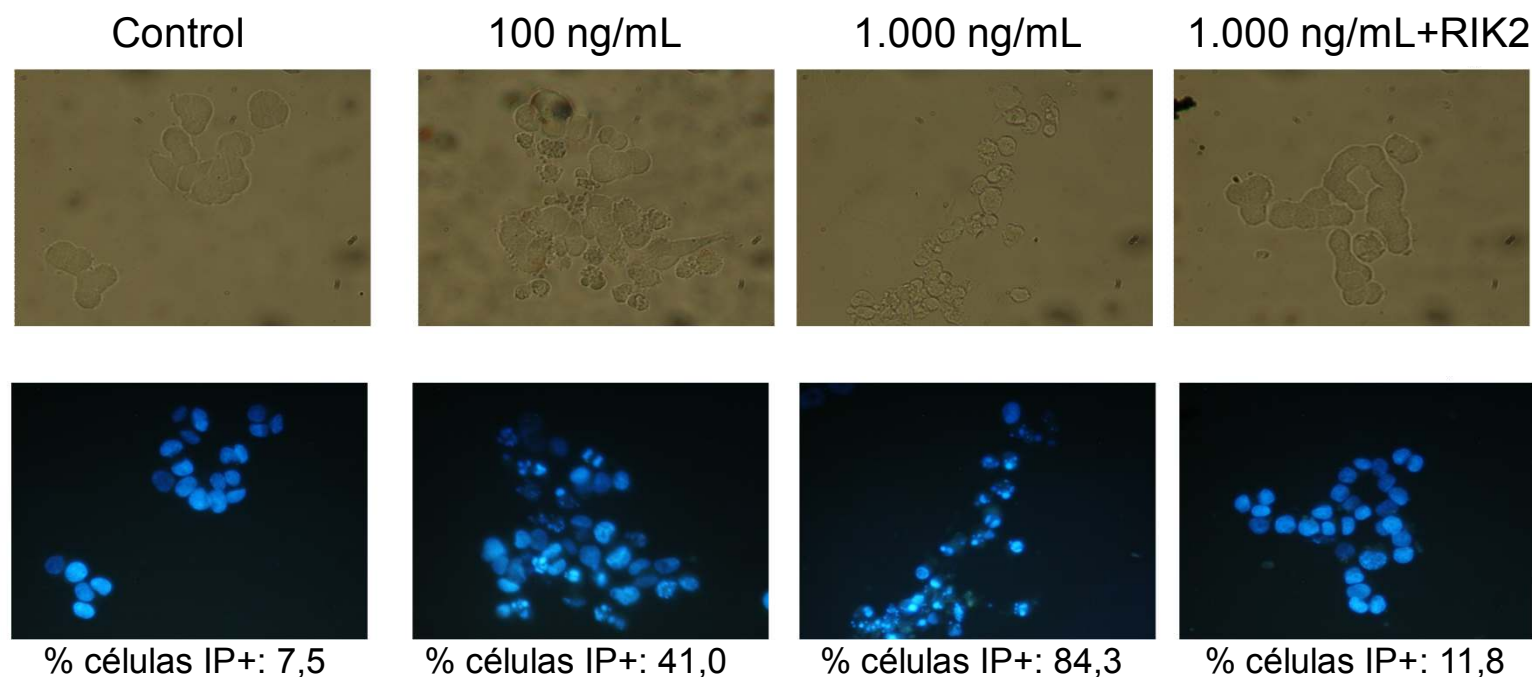


Figura 4. Análisis de la morfología nuclear tras el tratamiento con liposomas decorados con TRAIL en las células HCT-116. Las células se incubaron durante 12 horas con las concentraciones indicadas de TRAIL soluble (sTRAIL) o liposomas decorados con TRAIL (LUV-TRAIL). Posteriormente se fijaron las células con paraformaldehído al 4%, se añadió el colorante nuclear Hoechst 33342 y se observó la morfología nuclear mediante microscopía de fluorescencia. Los paneles superiores muestran las células observadas con la luz visible y los paneles inferiores muestran los núcleos observados mediante fluorescencia. Aumento original 400x. En paralelo se analizó la muerte celular mediante tinción con yoduro de propidio y cuantificación mediante citometría de flujo. Los porcentajes de células yoduro de propidio positivas (IP+) se indican debajo de cada fotografía.

Figura 5.

Activación de caspasas tras el tratamiento con LUV-TRAIL en células HCT-116

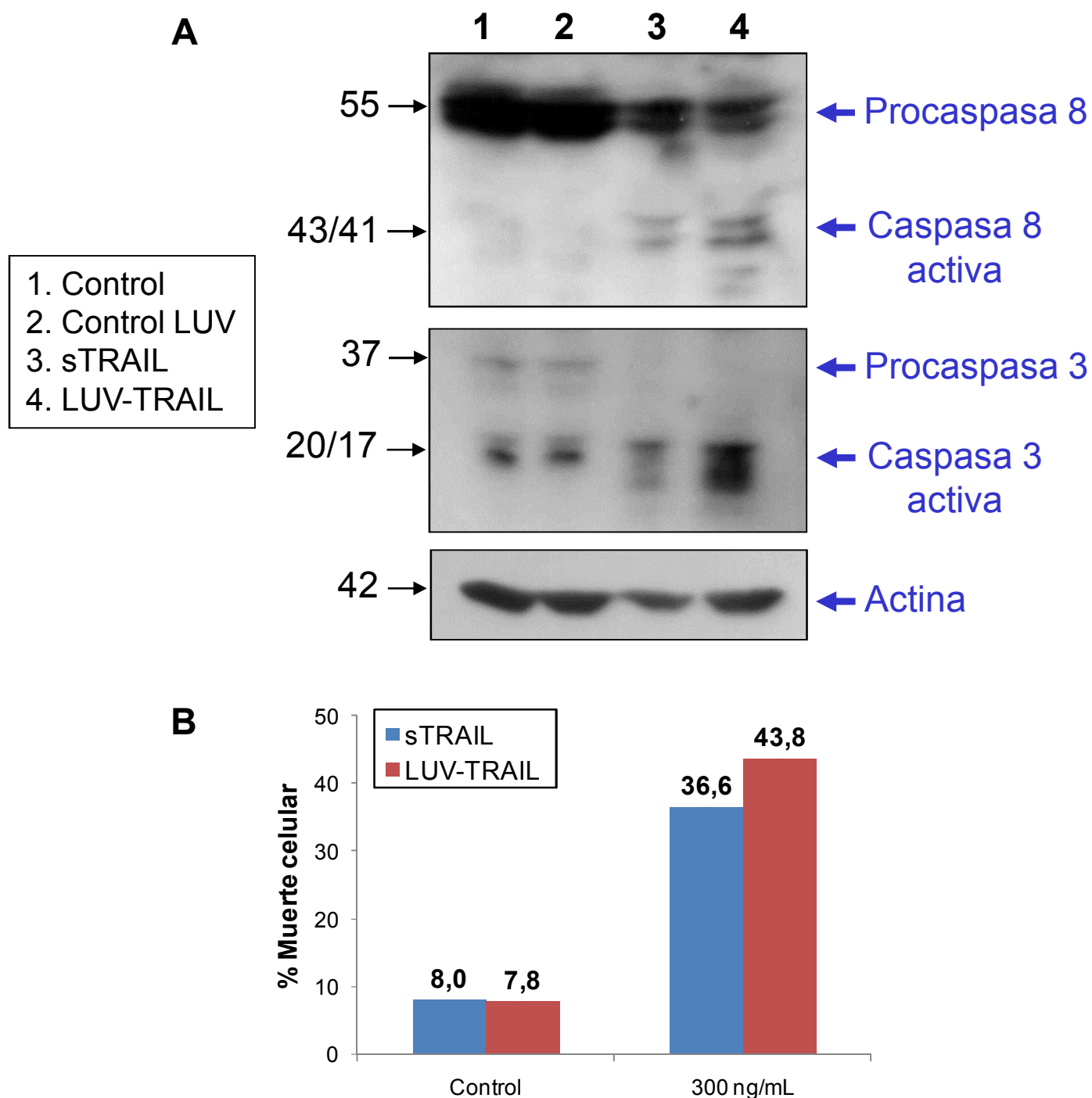


Figura 5. Activación de caspasas tras es tratamiento con LUV-TRAIL en células HCT-116. Se analizó la expresión de la caspasa 3 y la caspasa 8, tanto de sus forma pro-activa como de su forma activa en lisados de células HCT-116 tratadas con 300 ng/mL de TRAIL soluble (sTRAIL) o liposomas decorados con TRAIL (LUV-TRAIL) durante 16 horas. Tras separar las proteínas de los lisados mediante electroforesis desnaturizante en un gel de poliacrilamida al 12% fueron transferidas a una membrana de PDVF que fue incubada con las anticuerpos específicos correspondientes y revelada con el sustrato específico. **A)** Western-blot de las caspasas 8 y 3. En la izquierda del gel se indican los marcadores de peso molecular. Como control de carga se ha empleado el revelado de la actina. **B)** Antes de realizar el lisado celular, se tomó una alícuota de cada punto experimental y se analizó el porcentaje de muerte celular mediante tinción por exclusión con azul tripán.

Figura 6.

Inhibición de la apoptosis tras el tratamiento con inhibidores de caspasas en células HCT-116

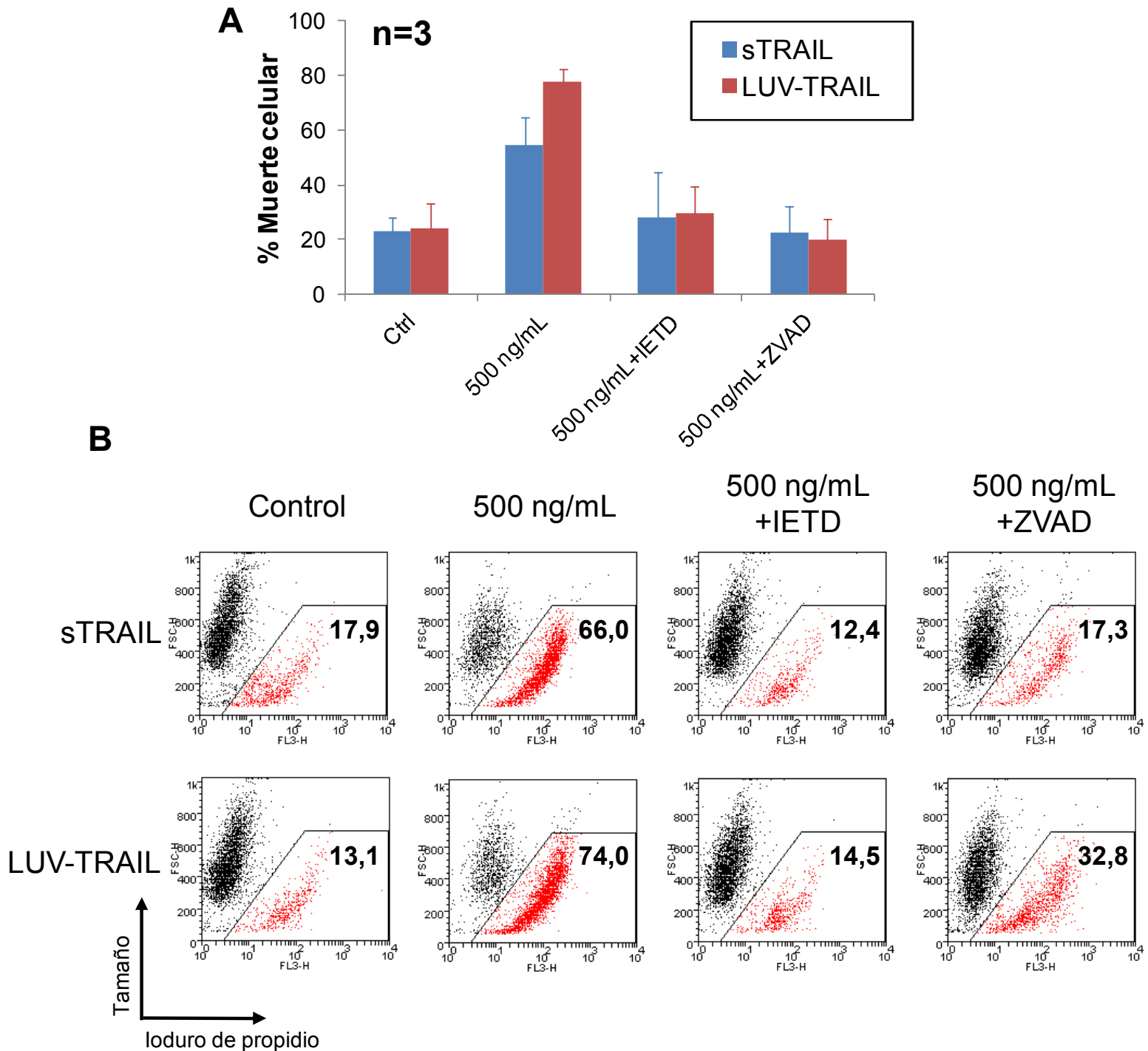


Figura 6. Inhibición de la apoptosis inducida por los LUV-TRAIL con los inhibidores de caspasas en células HCT-116. Las células se pre-incubaron durante 1 hora con el inhibidor general de caspasas ZVAD (30 μ M) o el inhibidor específico de la caspasa 8 IETD (30 μ M) y posteriormente se incubaron durante 24 horas con una dosis de 500 ng/mL de TRAIL soluble (sTRAIL) o liposomas decorados con TRAIL (LUV-TRAIL). La muerte celular se analizó cuantificando mediante citometría de flujo el porcentaje de células ioduro de propidio positivas. **A)** Gráfica en la que se muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos distintos. **B)** Histogramas de puntos de citometría en que se representa el tamaño celular y la tinción para ioduro de propidio de un experimento representativo.

Figura 7.

Expresión de receptores de TRAIL en células Caki-1

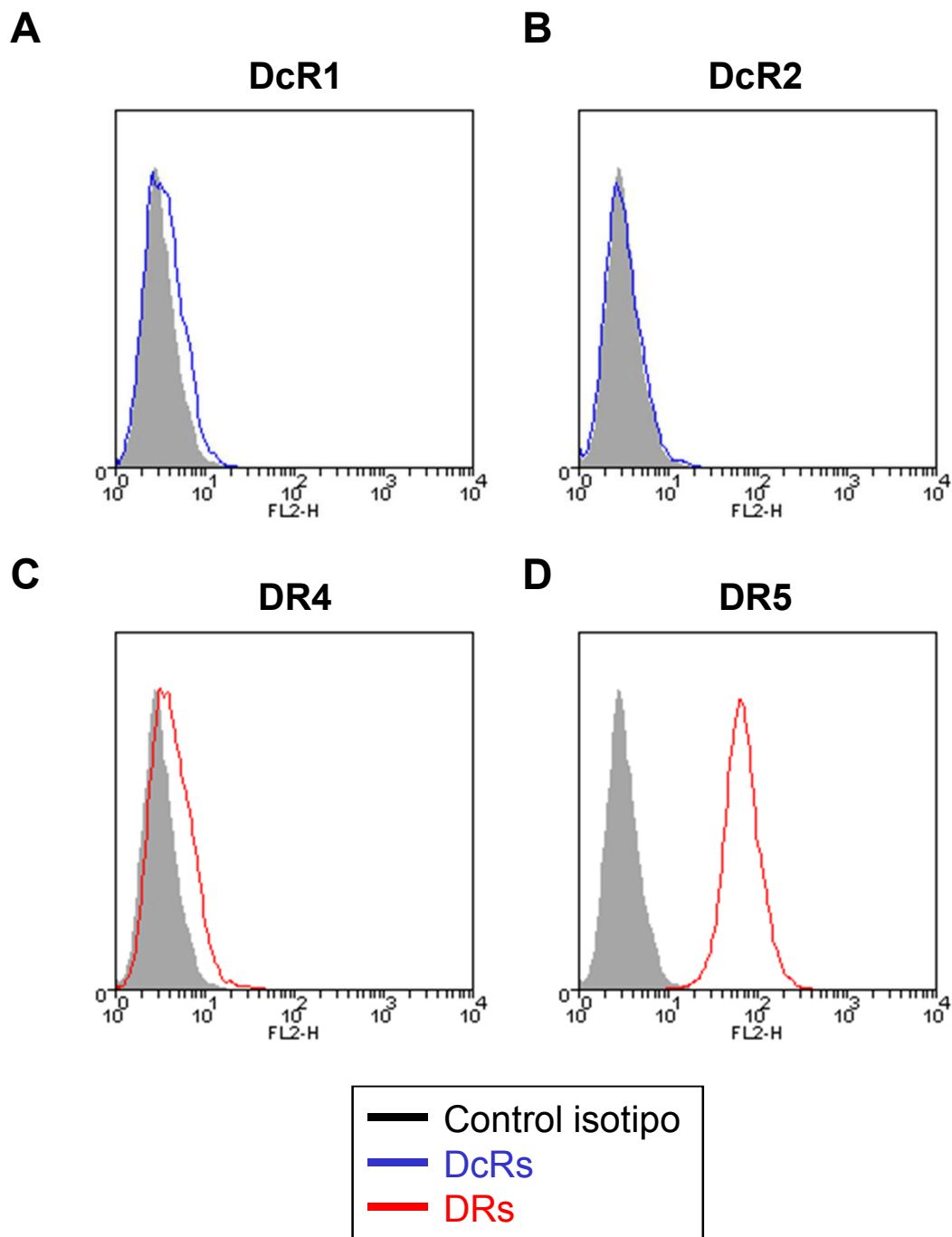


Figura 7. Expresión de los receptores de Apo2L/TRAIL en las células de cáncer de riñón Caki-1. Se tomaron 6 muestras de 100.000 células y cada una de ellas se incubó junto con el Ac correspondiente diluido en 100 μ L de PBS con un 5% de SFB para realizar el marcaje durante 30 minutos tras lo cual se lavaron dos veces con PBS con 5% de SFB y se analizaron mediante citometría de flujo. **A)** Expresión del receptor señuelo DcR1. **B)** Expresión del receptor señuelo DcR2. **C)** Expresión del receptor pro-apoptótico DR4. **D)** Expresión del receptor pro-apoptótico DR5. El histograma gris indica el control de isotipo.

Figura 8.

Ensayos de citotoxicidad con liposomas decorados con TRAIL (LUV-TRAIL) en células Caki-1

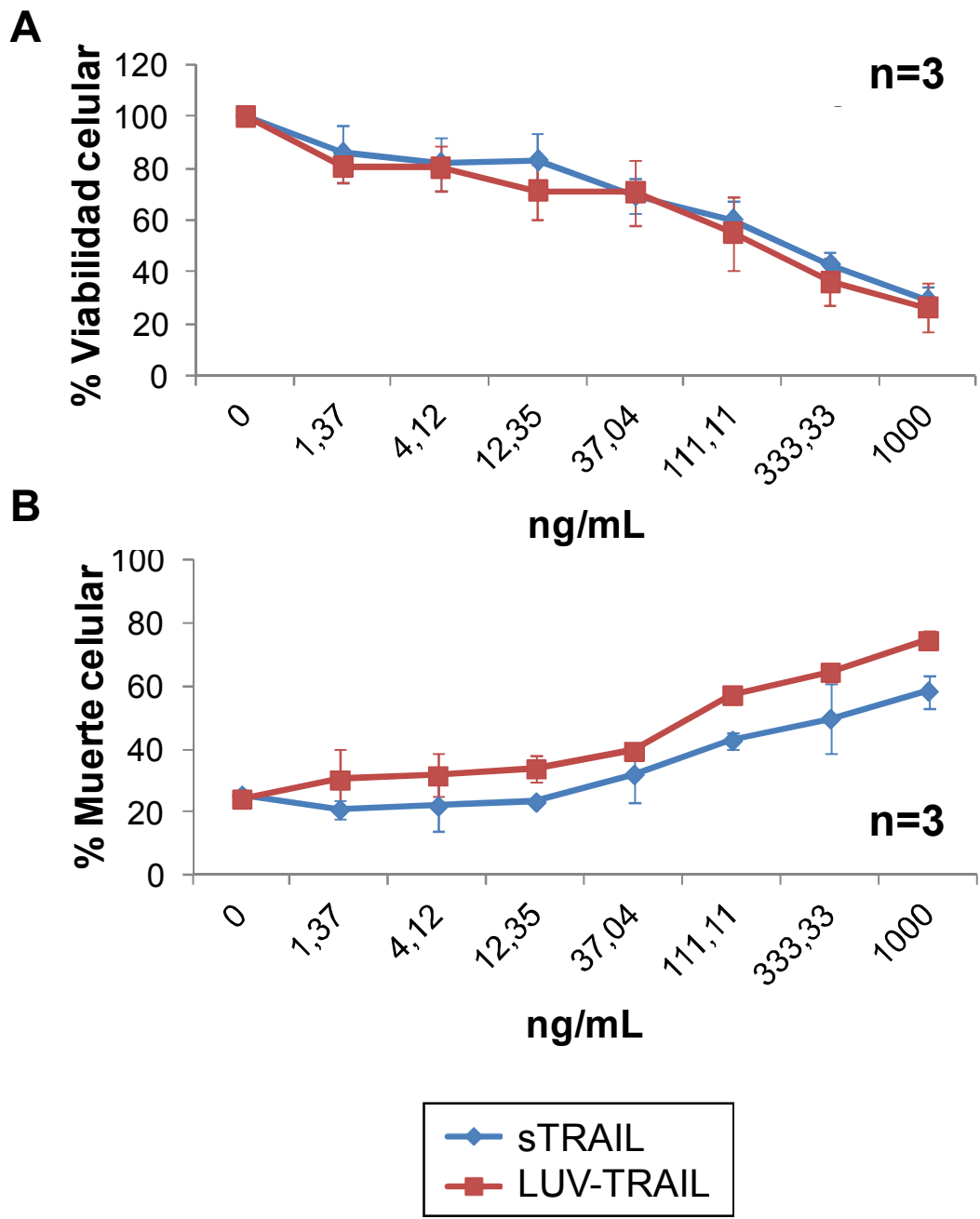


Figura 8. Ensayos de citotoxicidad con liposomas decorados con TRAIL en las células Caki-1. Se realizaron ensayos dosis-respuesta incubando las células durante 24 horas con las correspondientes dosis de TRAIL soluble (sTRAIL) y liposomas decorados con TRAIL (LUV-TRAIL). La capacidad citotóxica de ambos se analizó mediante: **A)** análisis de la disminución de la viabilidad mediante la técnica de reducción del MTT **B)** análisis de la muerte celular mediante tinción con yoduro de propidio y cuantificación mediante citometría de flujo. Las curvas representan la media de los experimentos realizados con su desviación estándar.

Figura 9.

Inhibición de la muerte celular tras el tratamiento con RIK2 en células Caki-1

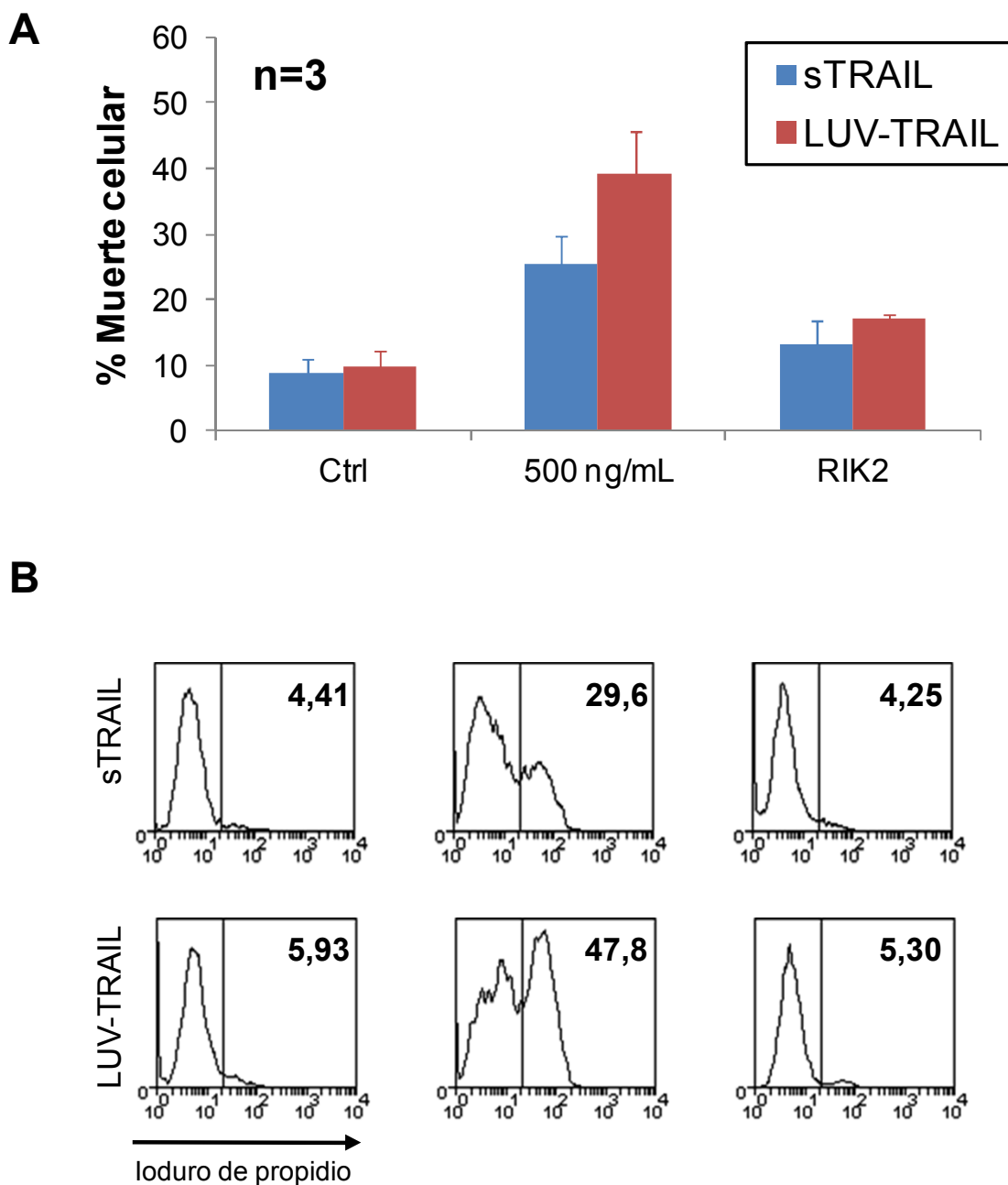
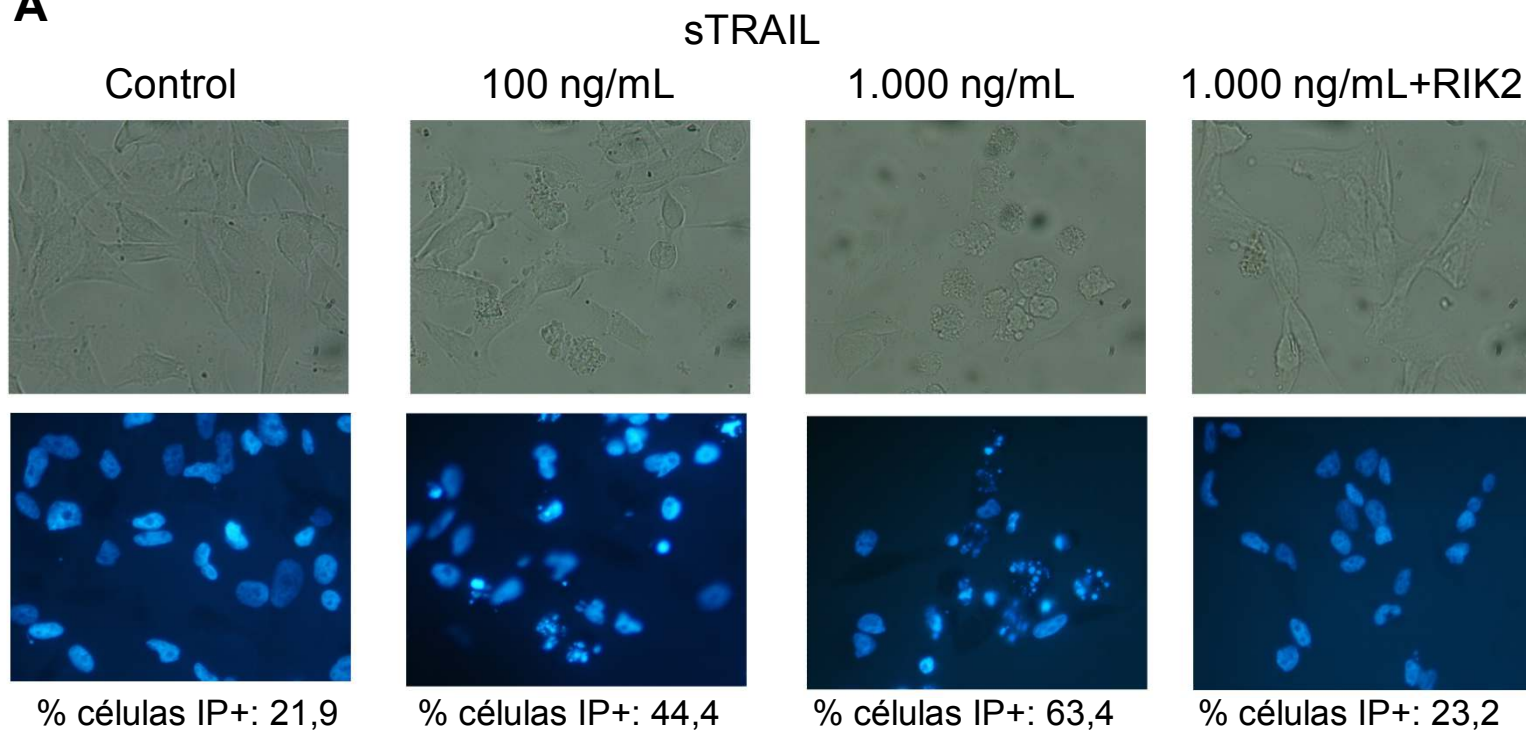


Figura 9. Inhibición de la muerte celular inducida por los LUV-TRAIL con un anticuerpo bloqueante de TRAIL en células Caki-1. Las células se pre-incubaron durante 1 hora con el anticuerpo monoclonal bloqueante de TRAIL, RIK2 a una concentración de 500 ng/mL y posteriormente se incubaron durante 24 horas con una dosis de 500 ng/mL de TRAIL soluble (sTRAIL) o liposomas decorados con TRAIL (LUV-TRAIL). La muerte celular se analizó cuantificando mediante citometría de flujo el porcentaje de células ioduro de propidio positivas. **A)** Gráfica en la que se muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos distintos. **B)** Histogramas de citometría de la tinción para ioduro de propidio de un experimento representativo.

Figura 10.

Morfología nuclear tras el tratamiento con LUV-TRAIL en células Caki-1

A



B

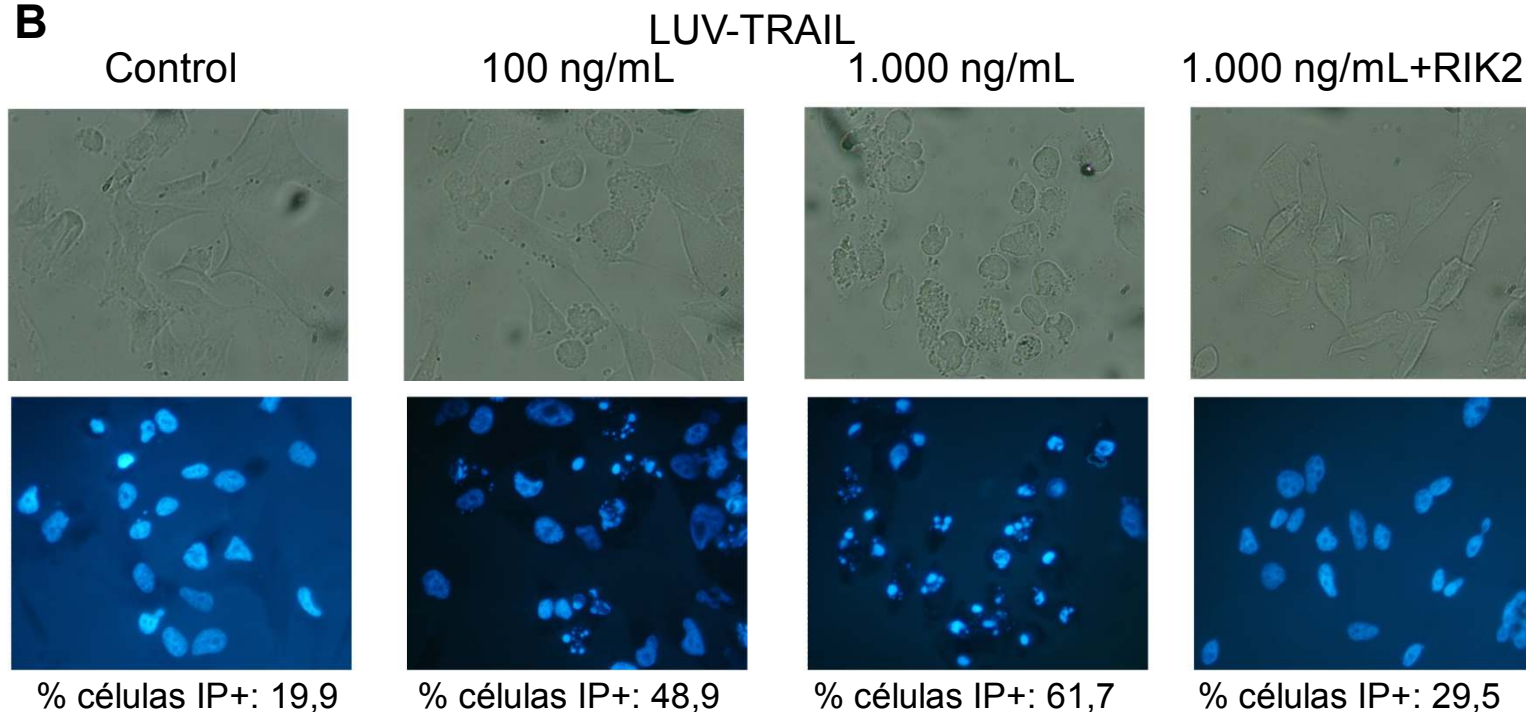


Figura 10. Análisis de la morfología nuclear tras el tratamiento con liposomas decorados con TRAIL en las células Caki-1. Las células se incubaron durante 12 horas con las concentraciones indicadas de TRAIL soluble (sTRAIL) o liposomas decorados con TRAIL (LUV-TRAIL). Posteriormente se fijaron las células con paraformaldehído al 4%, se añadió el colorante nuclear Hoechst 33342 y se observó la morfología nuclear mediante microscopía de fluorescencia. Los paneles superiores muestran las células observadas con la luz visible y los paneles inferiores muestran los núcleos observados mediante fluorescencia. Aumento original 400x. En paralelo se analizó la muerte celular mediante tinción con yoduro de propidio y cuantificación mediante citometría de flujo. Los porcentajes de células yoduro de propidio positivas (IP+) se indican debajo de cada fotografía.

Figura 11.

Activación de caspasas tras el tratamiento con LUV-TRAIL en células Caki-1

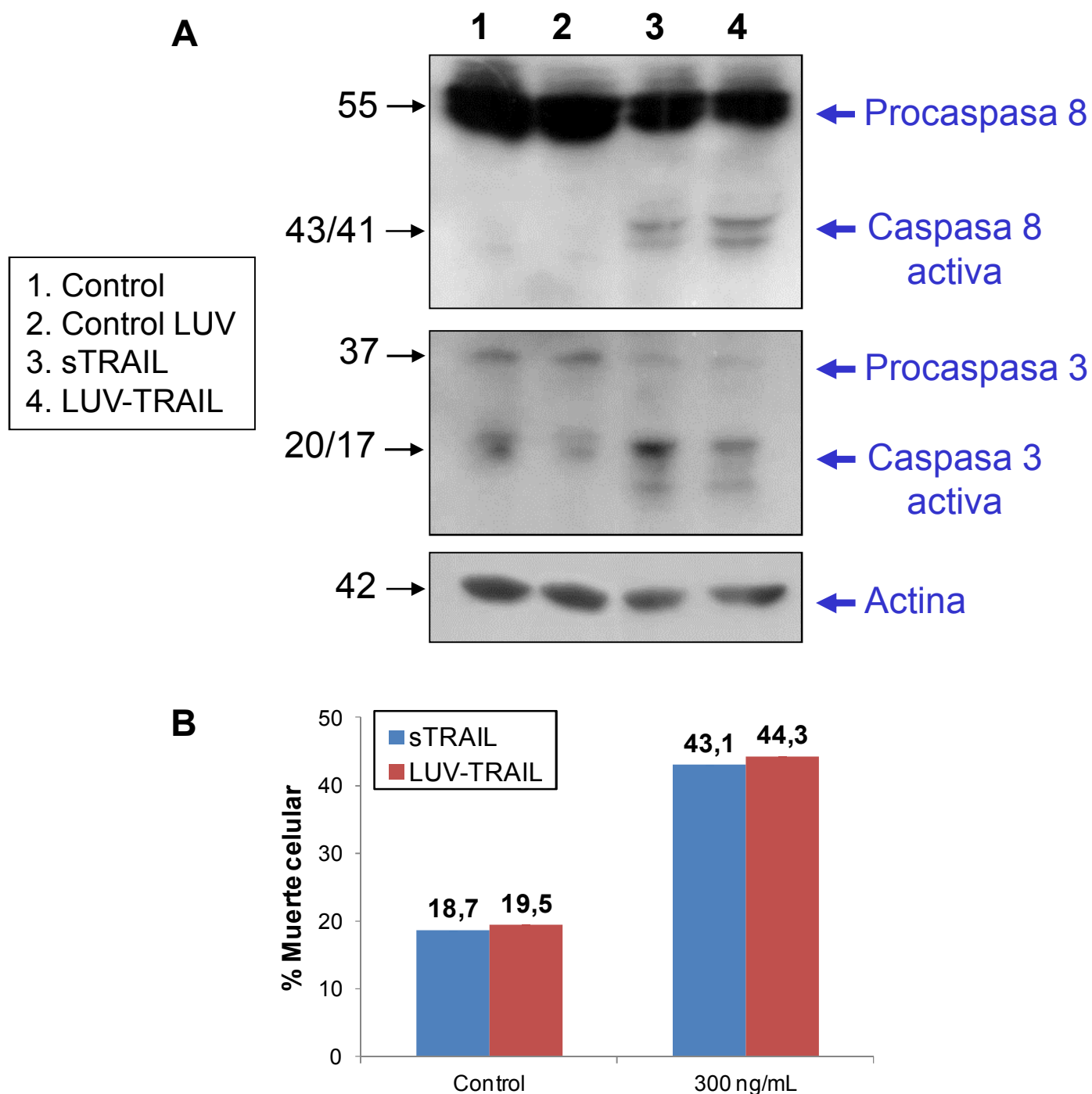


Figura 11. Activación de caspasas tras es tratamiento con LUV-TRAIL en células Caki-1. Se analizó la expresión de la caspasa 3 y la caspasa 8, tanto de sus forma pro-activa como de su forma activa en lisados de células HCT-116 tratadas con 300 ng/mL de TRAIL soluble (sTRAIL) o liposomas decorados con TRAIL (LUV-TRAIL) durante 16 horas. Tras separar las proteínas de los lisados mediante electroforesis desnaturizante en un gel de poliacrilamida al 12% fueron transferidas a una membrana de PDVF que fue incubada con las anticuerpos específicos correspondientes y revelada con el sustrato específico. **A)** Western-blot de las caspasas 8 y 3. En la izquierda del gel se indican los marcadores de peso molecular. Como control de carga se ha empleado el revelado de la actina. **B)** Antes de realizar el lisado celular, se tomó una alícuota de cada punto experimental y se analizó el porcentaje de muerte celular mediante tinción por exclusión con azul tripán.

Figura 12.

Inhibición de la apoptosis tras el tratamiento con inhibidores de caspasas en células Caki-1

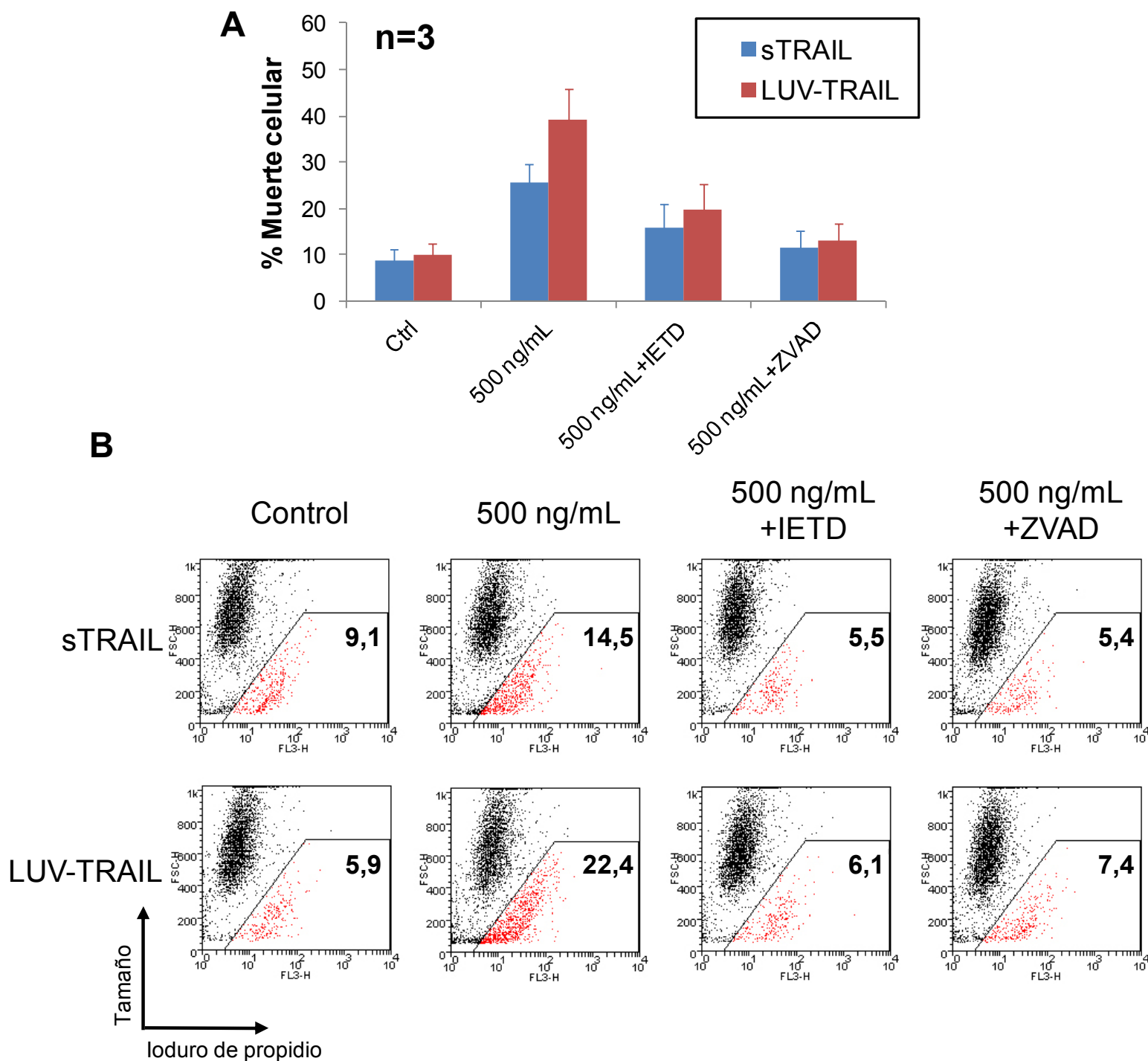


Figura 12. Inhibición de la apoptosis inducida por los LUV-TRAIL con los inhibidores de caspasas en células Caki-1. Las células se pre-incubaron durante 1 hora con el inhibidor general de caspasas ZVAD (30 μ M) o el inhibidor específico de la caspasa 8 IETD (30 μ M) y posteriormente se incubaron durante 24 horas con una dosis de 500 ng/mL de TRAIL soluble (sTRAIL) o liposomas decorados con TRAIL (LUV-TRAIL). La muerte celular se analizó cuantificando mediante citometría de flujo el porcentaje de células ioduro de propidio positivas. **A)** Gráfica en la que se muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos distintos. **B)** Histogramas de puntos de citometría en que se representa el tamaño celular y la tinción para ioduro de propidio de un experimento representativo.