



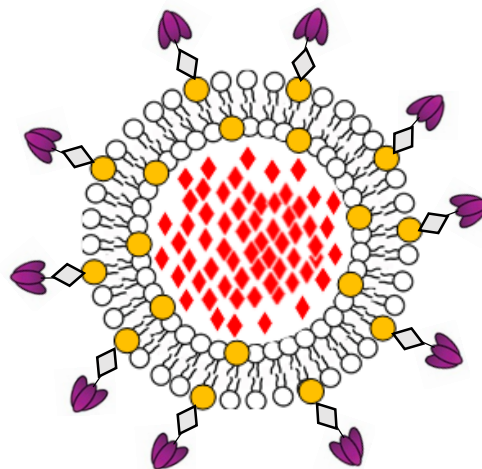
Universidad
Zaragoza

Facultad de Ciencias

**Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular y Celular**

Trabajo de Fin de Grado

**Análisis de nanopartículas lipídicas
funcionalizadas con capacidad citotóxica
como tratamiento anti-tumoral**



Autor:

Javier Plou Izquierdo

Directores:

Luis Martínez Lostao

Diego de Miguel Samaniego



Universidad
Zaragoza

D. Luis Martínez Lostao, Profesor del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, y D. Diego De Miguel Samaniego, Investigador del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN:

Que el Trabajo de Fin de Grado “**Análisis de nanopartículas lipídicas funcionalizadas con capacidad citotóxica como tratamiento anti-tumoral**”, ha sido realizado por **Javier Plou Izquierdo** en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza bajo nuestra dirección, que reúne, a nuestro juicio, las condiciones requeridas para ser presentado como Trabajo Fin de Grado y que cumple los objetivos recogidos en las Directrices TFG en Biotecnología.

Zaragoza, Junio de 2016

Fdo.: Dr. Luis Martínez Lostao

Fdo.: Diego De Miguel Samaniego

Resumen	1
Abstract	1
Antecedentes y objetivos	2
Introducción	4
Apoptosis	4
TRAIL	6
Apo2L/TRAIL en terapia antitumoral	7
Uso de liposomas en clínica	7
Doxorubicina	8
Material y métodos	8
Apo2L/TRAIL-His₆ recombinante	8
Preparación de nanopartículas lipídicas LUV-TRAIL	8
Preparación de nanopartículas lipídicas LUVDOX-TRAIL	9
Cultivos celulares	10
Obtención de PBMCs de sangre periférica y activación de células T	11
Ensayos de citotoxicidad	11
Ensayo de reducción del MTT	11
Marcaje con Anexina V	12
Marcaje de proteínas de superficie	12
Análisis de proteínas mediante <i>Western Blot</i>	13
Análisis estadístico	14
Resultados	15
Expresión basal de los receptores mortales de TRAIL	15
Citotoxicidad inducida por TRAIL	15
Activación de la apoptosis vía extrínseca por TRAIL	16
Potencial citotóxico de LUVDOX-TRAIL	17
Caracterización de la muerte celular inducida por LUVDOX-TRAIL (1/10)	18
Efecto citotóxico de LUVDOX-TRAIL en PBMCs y en células T activadas	19
Discusión	20
Conclusiones	24
Conclusions	24
Bibliografía	25

Resumen

La mejora de la bioactividad del ligando mortal TRAIL, ha sido un campo de investigación prometedor para el desarrollo de tratamiento anti-tumorales efectivos. En este trabajo de fin de grado se ha estudiado el potencial anti-tumoral de nuevas formulaciones de nanopartículas lipídicas funcionalizadas, basadas en el anclaje del ligando mortal TRAIL a su superficie (LUV-TRAIL) y en la encapsulación de doxorubicina, un quimioterápico muy utilizado con actividad anti-tumoral, en su interior (LUVDOX-TRAIL). Se ha analizado el efecto citotóxico de TRAIL soluble, LUV-TRAIL y LUVDOX-TRAIL y su capacidad para inducir apoptosis en tres líneas celulares tumorales humanas procedentes de diferentes neoplasias hematológicas, MOLT4, Raji y U937. También se ha estudiado la toxicidad de LUVDOX-TRAIL sobre células mononucleares de sangre periférica y linfocitos T activados normales, buscando una ventana terapéutica.

La formulación LUV-TRAIL presentó una mayor actividad citotóxica que TRAIL soluble en las líneas estudiadas, teniendo lugar un mecanismo de muerte dependiente de la activación de las caspasas. Los LUVDOX-TRAIL mostraron una mayor capacidad citotóxica que LUV-TRAIL en las tres líneas celulares, manteniendo una elevada citotoxicidad en células tumorales incluso cuando se disminuyó la cantidad de doxorubicina encapsulada a una concentración en la que los LUVDOX-TRAIL no mostraban una elevada toxicidad sobre células hematológicas normales.

Abstract

New TRAIL formulations with increased bioactivity are currently being developed with the aim of achieving an effective anti-tumour therapy. In this final project the anti-tumour potential of novel formulations using lipidic functionalized nanoparticles with the death ligand TRAIL attached on their surface (LUV-TRAIL) and doxorubicin, a conventional anti-tumoral drug, encapsulated inside the particles (LUVDOX-TRAIL) has been studied. The cytotoxic effect of soluble TRAIL, LUV-TRAIL and LUVDOX-TRAIL and their ability to induce apoptosis were analysed in three human cell lines derived from different haematological malignancies, MOLT4, Raji and U937. Moreover, LUVDOX-TRAIL toxic effect was also studied in peripheral blood mononuclear cells and activated T lymphocytes, in order to search a therapeutic window.

LUV-TRAIL showed higher cytotoxic activity than soluble TRAIL in all cell lines tested and cell death induced by LUV-TRAIL was a caspase-dependant process. LUVDOX-TRAIL showed a higher cytotoxic ability than LUV-TRAIL in the three cell lines analysed, keeping their high cytotoxicity even though the amount of encapsulated doxorubicin was reduced until a concentration in which LUVDOX-TRAIL did not show toxicity on normal haematological cells.

Antecedentes y objetivos

A pesar de los últimos avances en el entendimiento de la biología del cáncer y el desarrollo de nuevas estrategias para su diagnóstico, el cáncer se mantiene como una de las principales causas de muerte. La mayoría de las estrategias utilizadas por el momento carecen de la suficiente especificidad para no dar lugar a efectos secundarios severos. De esta manera, en la última década se está realizando un gran esfuerzo con el objetivo de diseñar terapias que ataquen selectivamente a las células cancerígenas y puedan superar los mecanismos de resistencia que presentan las células tumorales a las actuales terapias.

Apo2L/TRAIL (*Apo2 Ligand/TNF related apoptosis inducing ligand*) (en adelante, TRAIL), es un ligando mortal de la familia de los TNF, descubierto a mediados de la década de 1990 por dos grupos diferentes de forma simultánea e independiente a partir de la homología de la secuencia con TNF y FasL (Pitti et al., 1996; Wiley et al., 1995). El descubrimiento posterior de la capacidad de TRAIL para inducir la apoptosis sobre las células tumorales, manteniendo intactas a las células normales, despertó un gran interés en el desarrollo de terapias anti-tumorales basadas en TRAIL.

TRAIL es capaz de inducir la apoptosis en las células por medio de la unión a sus receptores TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R2/DR5. TRAIL se ha relacionado con funciones en las células con capacidad citotóxica y en la homeostasis de la respuesta inmune, actuando como mediador en muerte celular inducida por activación (AICD) de las células efectoras. Debido al alto grado de especificidad para inducir la muerte en las células tumorales y el hecho de que muchas células tumorales sobreexpresan los receptores DR4 y DR5, distintos agonistas de los receptores de TRAIL se han utilizado en aplicaciones clínicas (De Miguel et al., 2016).

Aunque los ensayos pre-clínicos resultaron prometedores, ningún ensayo clínico ha dado resultados con una eficacia significativa (Russo et al, 2010; Micheau et al, 2013). Esto se puede deber a que muchos tumores son resistentes a TRAIL soluble en monoterapia y a que los agonistas usados tenían baja afinidad por los receptores, entre otros factores. Por ello, en los últimos años, se han propuesto nuevas estrategias para mejorar la bioactividad de TRAIL, como el desarrollo de nuevas formulaciones de TRAIL altamente activas o la combinación con agentes sensibilizadores para superar la resistencia a TRAIL (De Miguel et al., 2016).

Profundizando en este hecho, el grupo de “Inmunidad, Apoptosis y Cáncer” del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza empezó hace años un proyecto para acoplar TRAIL a la superficie de nanopartículas lipídicas (LUV-TRAIL) con el fin de utilizarlos como tratamiento anti-tumoral. Los LUV-TRAIL tienen una composición lipídica similar a la de los exosomas naturales en los que los ligandos mortales se encuentran en forma de proteína transmembrana y suponen la forma fisiológica de secreción de TRAIL por parte de los linfocitos T activados.

En primer lugar y debido a la implicación de Apo2L/TRAIL en la regulación del sistema inmune, se emplearon los LUV-TRAIL in vivo en un modelo experimental de artritis reumatoide (Martínez Lostao et al., 2010), apreciándose una mejora en la reducción de la inflamación articular con respecto a TRAIL en su forma soluble.

Posteriormente se estudió la capacidad anti-tumoral de los LUV-TRAIL, analizando su efecto citotóxico en distintas líneas celulares tumorales humanas de estirpe hematológica, que o bien sobre-expresaban proteínas anti-apoptóticas o bien se habían silenciado proteínas pro-apoptóticas, lo que les confería resistencia no solo a la muerte inducida por Apo2L/TRAIL soluble sino también a la muerte celular inducida por los fármacos quimioterápicos convencionales (De Miguel et al., 2013). El análisis demostró que LUV-TRAIL tenían una capacidad citotóxica mayor que TRAIL soluble, siendo capaz de inducir la apoptosis en aquellas líneas celulares que presentaban resistencia frente a TRAIL. Recientemente, se ha concluido mediante experimentos de entrecruzamiento de los receptores TRAIL, que la mayor capacidad citotóxica de TRAIL recae en su mayor capacidad para inducir el entrecruzamiento de los receptores (De Miguel et al., 2015).

La nueva estrategia basada en los LUV-TRAIL ha tenido prometedores resultados, pero es necesario ampliar el estudio en líneas celulares tumorales provenientes de diferentes tumores y mejorar el potencial pro-apoptótico de LUV-TRAIL mediante la inclusión de moléculas que permitirán el aprovechamiento del liposoma para vehiculizar fármacos quimioterápicos, a la vez que inducen la apoptosis mediante la presencia de TRAIL en su superficie. En este sentido, el grupo está intentando desarrollar diferentes estudios para analizar la acción citotóxica de LUV-TRAIL con doxorubicina encapsulada, LUVDOX-TRAIL.

Con estos antecedentes, el objetivo principal de este trabajo de fin de grado ha sido continuar estudiando la capacidad de los LUV-TRAIL y su funcionalización con doxorubicina, LUVDOX-TRAIL, como tratamiento anti-tumoral. En este caso en líneas tumorales humanas de diferentes neoplasias hematológicas, con diferente sensibilidad a TRAIL soluble. Los objetivos concretos de este trabajo han sido:

1. Generar nanopartículas lipídicas artificiales de características similares en cuanto tamaño y composición lipídica a la de los exosomas naturales con TRAIL soluble anclado a la superficie.(LUV-TRAIL)
2. Analizar la capacidad de inducir apoptosis *in vitro* de los LUV-TRAIL y de TRAIL soluble en tres líneas celulares tumorales procedentes de diferentes neoplasias hematológicas, MOLT4, Raji y U937. Estudiando los mecanismos moleculares de inducción de la apoptosis
3. Encapsular doxorubicina en el interior de los LUV-TRAIL para generar los LUVDOX-TRAIL.
4. Analizar la capacidad citotóxica *in vitro* de los LUVDOX-TRAIL, en las tres líneas celulares de neoplasias hematológicas, y ajustar la concentración de doxorubicina encapsulada.
5. Estudiar la toxicidad de LUVDOX-TRAIL sobre células mononucleares de sangre periférica y linfocitos T activados normales provenientes de donantes sanos.

Introducción

Apoptosis

La apoptosis es el principal mecanismo de muerte celular programada en el organismo, y a su vez, el más intensamente estudiado. El proceso de apoptosis se activa y se ejecuta de una manera controlada y ordenada por medio de un conjunto de proteínas codificadas genéticamente.

La apoptosis desempeña un papel esencial en el desarrollo y la homeostasis de los tejidos adultos, eliminando aquellas células innecesarias o que han sufrido alteraciones irreparables (Taylor et al., 2008). La capacidad de las células para evadir la apoptosis es uno de los problemas que contribuyen a la aparición de distintas patologías, entre ellas, el cáncer, así como al desarrollo de resistencia a terapias anti-tumorales.

Las células apoptóticas se van a definir por una serie de rasgos morfológicos y bioquímicos que permiten su identificación. Inicialmente, se aprecia una condensación del citosol acompañado de la compactación y fragmentación de la cromatina, paralelamente, la dilatación del retículo endoplásmico, acabará originando la formación de vesículas que se fusionarán con la membrana celular generando la morfología característica de burbujas denominadas cuerpos apoptóticos. Entre los cambios bioquímicos, se produce la caída del potencial mitocondrial y la translocación de la fosfatidilserina desde la capa interna de la membrana celular (donde se localiza normalmente) a la capa externa. Este último hecho, facilitará el reconocimiento de los cuerpos apoptóticos y su fagocitosis por los macrófagos. La actuación de los macrófagos permitirá que no se libere al medio el contenido intracelular de la célula dañada, el cual ocasionaría daños en las células adyacentes al inducirse la respuesta inflamatoria.

A parte de por la mencionadas características morfológicas, la apoptosis se caracteriza a nivel molecular por ser ejecutada por una familia de proteasas localizadas en el citoplasma conocidas como caspasas. Expresadas como zimógenos inactivos (conocidos como pro-caspasas), su activación va a estar estrechamente regulada por un proceso de escisión (auto-proteólisis o por acción de otras caspasas) y oligomerización. Las caspasas que intervienen en la apoptosis han sido tradicionalmente clasificadas en dos grupos:

- Caspasas iniciadoras: caspasa -2, -8, -9 y -10, estructuralmente se pueden clasificar en función de la presencia de una secuencia de aminoácidos que les permiten establecer interacciones proteína-proteína entre dominios idénticos. Dichos dominios son CARD (*caspase activation and recruitment domains*) en las caspasas -2 y -9 y DED (*death-effector domain*) en las caspasas -8 y -10
- Caspasa efectoras: caspasa -3, -6 y -7, activadas por las caspasas iniciadoras por proteólisis, se encargarán de continuar y amplificar la señal apoptótica.

Las caspasas al ser proteolizadas dan lugar a dos subunidades (p20 y p10) que interaccionan formando un heterodímero, que a su vez interacciona con otro para dar un heterotetrámero, que es la forma típicamente activa de las caspasas (Shalini et al., 2008).

Vías de la apoptosis:

La apoptosis puede ser activada por medio de dos vías diferentes:

- **Vía intrínseca:**

La vía intrínseca o mitocondrial, debido a la actuación de la mitocondria como elemento regulador, fue la primera descrita y es la más conservada evolutivamente. Esta vía es activada a partir de señales de estrés celular, provocadas por agresiones externas que conducen a un daño irreversible en el DNA. Esta alteración en el DNA, es detectada principalmente por la proteína p53, que se fosforila y actúa como un factor de transcripción para genes implicados en la regulación del ciclo celular, reparación del DNA y expresión de proteínas pro-apoptóticas, lo que conduce a una alteración en el equilibrio entre las proteínas pro- y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2. Las proteínas de la familia Bcl-2 se identificaron por su homología de dominios (dominios BH) y constituyen los principales reguladores de la integridad de la membrana mitocondrial. Se distinguen 3 subfamilias:

- Proteínas *solo BH3* (Bid, Puma, Noxa, Bim): presentan únicamente el dominio BH3, y están encargadas de detectar los estímulos que inducen estrés en la célula y activar la vía intrínseca mediante interacciones con proteínas pro- y anti-apoptóticas.
- Proteínas anti-apoptóticas (entre ellas: Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xL): se asocian con las proteínas Bcl-2 pro-apoptóticas inhibiendo su acción.
- Proteínas pro-apoptóticas (entre ellas: Bax, Bak): la interacción entre Bax y Bak conduce a la formación de canales en la membrana externa mitocondrial, produciendo su permeabilización, la caída del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y la salida de proteínas pro-apoptóticas desde la matriz mitocondrial al citosol como citocromo c o Smac/DIABLO.

En el citosol, el citocromo C liberado se une a la molécula adaptadora Apaf-1 y a la pro-caspasa 9 promoviendo la formación de un complejo denominado apoptosoma, en el que se activa la pro-caspasa 9. La caspasa 9 producirá la activación por proteólisis de las caspasas ejecutoras (fundamentalmente caspasa-3 y -7) que conducirán a la muerte celular por apoptosis (Taylor et al., 2008).

- **Vía extrínseca:**

La vía extrínseca se ejecuta por la interacción de los ligandos mortales con sus respectivos receptores (DR) en la superficie de la célula diana. Los ligandos mortales pertenecen a la familia de los TNF (TNF- α , FasL y TRAIL) y los DR pertenecen a la familia de los TNF-R. Mientras que FasL y TRAIL tienen una acción prominentemente apoptótica, TNF activa predominantemente vías pro-inflamatorias.

La apoptosis a través de la vía extrínseca se desencadena tras la interacción de los ligandos mortales, en forma de homotrímeros, con sus respectivos receptores en la membrana celular, induciendo a su vez la trimerización de éstos y ocasionando una serie de cambios conformacionales del receptor en la superficie celular. Como consecuencia de dicho cambio conformacional, los dominios intracelulares del receptor, conocidos como DD (*death domain*), sufren una reorganización espacial que permite el reclutamiento de una proteína adaptadora (FADD, *Fas-Associated protein with Death Domain*, en el caso de FasL y TRAIL, y TRADD, *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein* en el caso de TNF) que se unirá al receptor a través

de sus propios dominios DD. Dicho adaptador carente de actividad enzimática, ejercerá su función como plataforma para el reclutamiento de las caspasas iniciadoras (caspasa -8, caspasa -10) mediante los dominios DED. Se formará finalmente un complejo multimolecular conocido como DISC (*Death-inducing signaling complex*), para FasL y TRAIL, y TNF-RSC (*TNF-Receptor signaling complex*) para TNF, diferenciándose en la complejidad molecular de sus componentes y la capacidad para activar diferentes vías. A nivel del DISC, una de las proteínas principales capaz de regular la activación de la caspasa-8 y la activación de diferentes vías es cFLIP, la cual será capaz de unirse a FADD y a la caspasa-8 por sus dominios DED. La proteína cFLIP tiene principalmente una función anti-apoptótica.

La caspasa-8 puede procesar directamente a las caspasas ejecutoras (principalmente a la caspasa-3), dirigiendo a la célula hacia la apoptosis (Shalini et al., 2008). Conjuntamente, la acción proteolítica de la caspasa-8 sobre su sustrato Bid, proteína de la familia *solo BH3*, permite intercomunicar la vía extrínseca con la intrínseca. La formación de t-Bid (forma truncada y activa de Bid) inducirá la oligomerización de Bax y Bak y acabará conduciendo a la formación del apoptosoma. De esta manera, se genera un bucle de amplificación de la señal que desemboca en un incremento de la activación de las caspasas efectoras (Sedger et al., 2014).

TRAIL

TRAIL es un ligando mortal de la familia del TNF capaz de inducir la apoptosis independientemente de Fas (Pitti et al., 1996; Wiley et al., 1995). Es una proteína transmembrana de tipo II de 281 aminoácidos y 28 kDa de peso molecular codificada por el gen TNFSF10 de 20 kb localizado en la posición 3q26 del cromosoma 3, que consta de 4 intrones y 5 exones. Aunque la homología de TRAIL con TNF- α y FasL es solo del 23% y 28% respectivamente, muestran gran similitud estructural. En el desarrollo de este trabajo se ha utilizado la porción extracelular soluble de TRAIL (sTRAIL), formada por los aminoácidos 114 al 281 a los que se les ha añadido una cola de histidinas en el extremo amino-terminal.

TRAIL forma un homotrímero que se unirá a tres receptores en la superficie de la célula diana. Sin embargo, al contrario que otros miembros de la familia de TNF, el trímero necesita ser estabilizado por un átomo de Zinc unido a las cisteínas en el centro del trímero, siendo crucial para su estabilidad y actividad. TRAIL posee 5 receptores, TRAIL-R1/DR4 TRAIL-R2/DR5 TRAIL-R3/DcR1, TRAIL-R4/DcR2 y osteoprotegerina. DR4 y DR5 son los únicos que pueden desencadenar la señalización apoptótica, siendo capaces de originar la formación del DISC y la activación de la caspasa-8. Por el contrario, DcR1 y DcR2 serán incapaces de transducir la señal apoptótica al carecer, en el caso de DcR1 de toda la porción intracelular, y en el caso de DcR2 de dominios mortales funcionales. (Newson et al., 2009)

La principal función fisiológica de TRAIL es la regulación de la respuesta inmune, aunque su habilidad para inducir la muerte de células transformadas ha sido intensamente detallada. En la actualidad se sabe que TRAIL es expresado en diversas células del sistema inmunológico como linfocitos T CD4+ y CD8+ activados, células NK, macrófagos y células dendríticas. En linfocitos T activados, TRAIL es secretado como una proteína transmembrana insertada en la membrana lipídica de unas vesículas llamadas exosomas (Martinez-Lorenzo et al., 1999).

Apo2L/TRAIL en terapia anti-tumoral

Desde el descubrimiento de TRAIL y debido a su capacidad de inducir apoptosis en células tumorales de manera selectiva, surgió rápidamente el interés de utilizar esta molécula en clínica como agente anti-tumoral. Se desarrollaron dos estrategias clínicas, por un lado, la utilización de TRAIL soluble humano recombinante y por otro, el uso de anticuerpos monoclonales agonistas de los receptores DR4 y DR5. Sin embargo, los resultados clínicos obtenidos, aunque garantizaban la seguridad de tratamiento, no mostraban beneficios significativos (Lemke et al., 2014). Este fracaso terapéutico estaba condicionado por una serie de factores: por un lado el bajo perfil farmacocinético de TRAIL recombinante (con una vida media de unos 20 minutos) y la baja afinidad de los agonistas por los receptores y por otro lado, el desarrollo de resistencias por parte de muchos tumores al aplicar TRAIL soluble en monoterapia (Russo et al., 2010; Micheau et al., 2013)

De esta manera, en los últimos años, se están desarrollando nuevas estrategias que persiguen mejorar la bioactividad de TRAIL por medio de los siguientes aspectos: i) incrementar la estabilidad y la valencia de Apo2L/TRAIL manteniendo la baja citotoxicidad ii) dirigir de forma directa Apo2L/TRAIL a las células tumorales iii) combinación con otras terapias. Atendiendo a estos aspectos, se están desarrollando novedosas versiones de agonistas de TRAIL-R con características prometedoras. Además de la combinación con otros fármacos, estas nuevas formulaciones estarán basadas en el aumento de la estabilidad de TRAIL, mejorando su bioactividad como en izTRAIL (TRAIL soluble con una cola de isoleucinas), la fusión de TRAIL con anticuerpos de cadena sencilla (scFv) dirigidos contra antígenos específicos expresados en la superficie del tumor o en las células del microambiente tumoral y la asociación de TRAIL a distintas plataformas de tamaño nanométrico (De Miguel et al., 2016).

De esta manera y teniendo en cuenta el proceso fisiológico de secreción de TRAIL, como proteína transmembrana en exosomas, el Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza inició un proyecto para acoplar TRAIL recombinante a liposomas artificiales con características similares a los exosomas fisiológicos con intención de aumentar su bioactividad (De Miguel et al., 2013. De Miguel et al., 2015. De Miguel et al., 2016).

Uso de liposomas en clínica

Los liposomas son nanovesículas constituidas por una bicapa lipídica de fosfolípidos que encierra un medio acuoso interno. Esta estructura permite, por un lado, que los fármacos más hidrofílicos tiendan a encapsularse en su núcleo polar, mientras que los más hidrofóbicos se transportarán embebidos en la membrana plasmática.

Los liposomas se pueden clasificar en unilamelares entre los que se encuentra los SUV (*small unilamellar vesicles*, de entre 50-100 nm) y los LUV (*large unilamellar vesicles*, de entre 100-250 nm) ideales para el transporte de fármacos hidrosolubles y en multilamelares (MLV, *multilamellar vesicles*, de entre 1-5 μ m), compuestos por varias capas lipídicas y un limitado espacio acuoso, ideal para el transporte de los fármacos más hidrofóbicos.

Los liposomas parecen ser una de las alternativas más prometedoras en el transporte de fármacos, dada su capacidad inherente para la encapsulación de los fármacos, su biocompatibilidad y su buena farmacocinética (Davis et al, 2008). Además, el hecho de que los capilares sanguíneos y linfáticos en los tumores se encuentren fenestrados, el paso de los liposomas hacia el tumor vascularizado se ve facilitado respecto al paso de los fármacos libres (Fang et al, 2011)

Doxorubicina

La doxorubicina es un antibiótico de la familia de las antraciclinas (aislado de *Streptomyces peucetius*), ampliamente usado en el tratamiento de distintos tipos de tumores. Con un mecanismo de acción complejo, la doxorubicina se intercala en el DNA bloqueando su síntesis y transcripción, y además actúa bloqueando a la topoisomerasa II, lo que acaba generando fragmentación y alteración del DNA.

En respuesta al daño en el DNA inducido por la doxorubicina en la célula tumoral se producirá la activación de la vía intrínseca de la apoptosis mediada por la activación de la proteína p53. Además, estudios recientes han demostrado la interacción entre el daño en el DNA y la activación de RIPK3 Y MKLK conduciendo a la necroptosis. (Matt et al, 2015)

A pesar de su amplio espectro de actividad neoplásica, sus efectos adversos, particularmente la cardiotoxicidad y la depresión hematológica, han limitado el uso convencional de la doxorubicina en la práctica clínica. Para evitar dichos efectos adversos, en los últimos años, se ha llevado a cabo la generación de nuevas formulaciones de doxorubicina, basadas en la utilización de doxorubicina encapsulada en liposomas (Tahover et al., 2015). Precisamente, fue la doxorubicina, el primer fármaco encapsulado en liposomas aprobado por la FDA, bajo la denominación comercial de Doxil®.

Material y métodos

Apo2L/TRAIL-His₆ recombinante.

Para este trabajo se ha empleado la parte extracelular de Apo2L/TRAIL-His₆ humano, correspondiente a los aminoácidos de 114 a 281 de la proteína nativa, con una cola de 6 histidinas en su extremo N-terminal (TRAIL-His₆). Este TRAIL recombinante (a partir de ahora denominado TRAIL soluble, sTRAIL) se conservó para su uso a una concentración 50 µg/ml y 12 µg/ml en PBS a 4°C.

Preparación de nanopartículas lipídicas LUV-TRAIL

Se prepararon liposomas tipo LUV de 150 nm de diámetro. El tamaño y la composición de los mismos se mantuvieron constantes a lo largo de todo el trabajo, mimetizando a los exosomas naturales secretados por los linfocitos T (Martinez-Lorenzo et al., 1999).

Los liposomas tipo LUV se prepararon según el método de hidratación en film. Para ellos, se partió inicialmente de una mezcla lipídica de fosfatidilcolina, esfingomiélna, colesterol y DOGS-NTA-Ni (lípidos artificiales con un átomo de níquel en su estructura) (*Avanti Polar Lipids*) en una proporción 55:30:10:5. El lípido artificial DOGS-NTA-Ni será el elemento responsable de la fijación iónica de sTRAIL a la superficie del LUV mediante la interacción entre el níquel del lípido y la cola de histidinas de la proteína recombinante. Tras la preparación de la mezcla lipídica en un *Eppendorf*, el disolvente orgánico (cloroformo) de los lípidos fue eliminado mediante la aplicación de una corriente de nitrógeno durante 10 minutos y sometidos luego a condiciones de vacío durante 6 horas. Una vez finalizado este procedimiento, las láminas lipídicas secas que se encontraban en el fondo del tubo se resuspendieron en un tampón de PBS formándose los liposomas tipo MLV. Con el objetivo de eliminar varias capas lipídicas y obtener una población de liposomas tipo LUV con el diámetro deseado, los MLV se congelaron/descongelaron una vez y se sometieron a 10 ciclos de un proceso de extrusión en flujo de nitrógeno, haciendo pasar los liposomas a través de 2 filtros de

policarbonato (*Whatman*) con un diámetro de poro de 200 nm. El proceso de extrusión fue llevado a cabo usando un extruder (*Northern Lipids*) obteniendo finalmente liposomas tipo LUV de aproximadamente 150 nm que se almacenan a 4°C hasta su utilización.

La funcionalización de los LUV, para obtener LUV-TRAIL, se realizó incubando los LUV con sTRAIL a 37°C durante 30 minutos y en agitación a 850 rpm empleando el incubador *Thermomixer* (*Eppendorf*). La interacción de los residuos de histidina de la cola de histidinas de sTRAIL con el átomo de Níquel de los LUV, permitió la obtención de los LUV-TRAIL con un ratio $\mu\text{g proteína}/\mu\text{mol de lípidos totales}$ de 4.8, y una concentración final de TRAIL y lípidos totales de 12 $\mu\text{g/ml}$ y 2.5 mM respectivamente. Finalmente LUV-TRAIL se conservaron a 4°C hasta su uso.

Preparación de nanopartículas lipídicas LUVDOX-TRAIL

La doxorubicina se introdujo en el interior de los liposomas por medio de la técnica de *gradiente de pH*. Para ello, se generaron LUV con sulfato de amonio en su interior (LUV-AS) siguiendo la misma metodología descrita para la producción de LUV, pero con dos diferencias significativas.

- La resuspensión de la lámina de lípidos tras someterla a condiciones de vacío se realizó con 300 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sulfato de amonio, AS) a pH=4 en lugar de PBS.
- Una vez que los LUV-AS fueron sometidos al proceso de extrusión, se filtraron a través de una columna PD-10 (*GE Healthcare*) para cambiar el tampón externo de los liposomas por PBS, con el objetivo de crear un gradiente iónico y de pH entre el medio externo (PBS) y el interior del liposoma (AS).

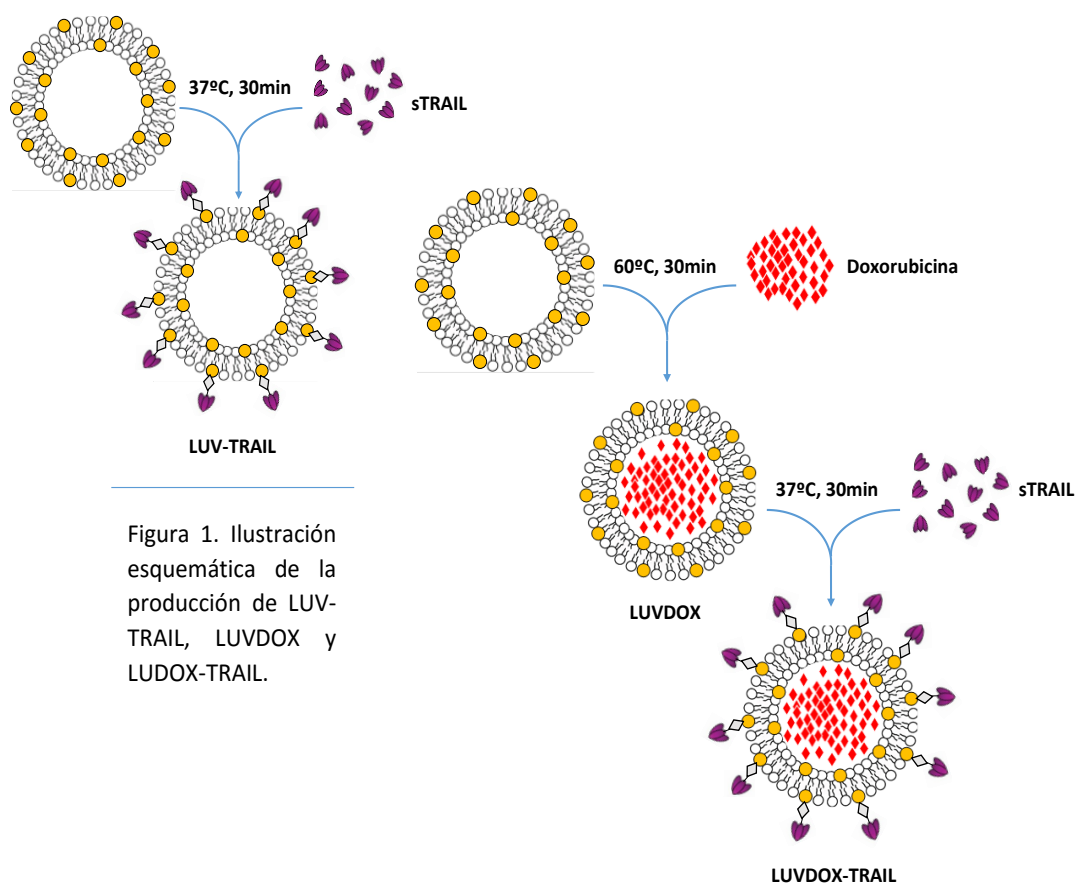


Figura 1. Ilustración esquemática de la producción de LUV-TRAIL, LUVDOX y LUVDOX-TRAIL.

Una vez obtenidos los LUV-AS, se incubaron con doxorubicina (DOX, 10 mg/ml) en una relación molar de DOX/lípido de 1/3.2. El proceso se dividió a su vez en dos etapas con el objetivo de optimizar la encapsulación y el acoplamiento de sTRAIL en la membrana:

- i) La mezcla de DOX y LUV-AS se incubó a 60°C (temperatura de transición de la membrana) durante 30 minutos, y con una intensa agitación (800 rpm). La DOX libre se introdujo en el interior del liposoma, protonándose en su interior debido al pH ácido. Este proceso conlleva la precipitación del fármaco en el interior del liposoma generando liposomas con DOX en su interior (LUVDOX), siendo incapaz la DOX de atravesar de nuevo la membrana.
- ii) Para generar LUVDOX con sTRAIL acoplado a su superficie (LUVDOX-TRAIL), se siguió el protocolo ya descrito para los LUV-TRAIL, consiguiendo la unión de sTRAIL a la membrana del liposoma. El volumen final se ajustó con PBS, obteniendo los LUVDOX-TRAIL con una concentración final de DOX y TRAIL, de 775 µM y 12 µg/ml respectivamente.

Para la producción de los LUVDOX-TRAIL (1/10) se mantuvo el mismo protocolo variando la concentración inicial de DOX (1 mg/ml), y modificando por tanto la relación molar de DOX/lípido (1/32) y la concentración final de DOX encapsulada (77,5 µM)

Cultivos celulares

Todos los ensayos se realizaron de manera paralela en tres líneas celulares: MOLT4, Raji y U937, ambas tienen en común su origen a partir de diferentes neoplasias hematológicas humanas, por lo que se cultivaron en suspensión. i) MOLT4: linfocitos T procedentes de una leucemia linfoblástica aguda ii) Raji: linfocitos B procedentes de un linfoma de Burkitt. iii) U937: monocitos procedentes de un linfoma histiocítico.

Las 3 líneas celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 (*Gibco*) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, 2 mM L-glutamina y antibióticos (penicilina 100 µg/ml, estreptomycin 100 µg/mL) (a partir de ahora, medio completo). Se realizaron de manera rutinaria (cada dos días) ajustes del medio para mantener el cultivo a densidades comprendidas entre 2×10^5 y 1×10^6 células/ml en frascos de cultivo de 25 y 75 cm². Las células se mantuvieron a 37°C, bajo una atmósfera constante de CO₂ al 5% en un incubador termostático (*Heraeus Cell*). Todas las manipulaciones de los cultivos se realizaron con material estéril y en campanas de flujo laminar (*Telstar*).

Para el mantenimiento de los cultivos en las densidades celulares adecuadas fue necesario un control diario de la densidad y viabilidad celular, a través de la tinción por exclusión con azul tripán y conteo en una cámara de *Neubauer*.

DENSIDAD CELULAR:

$$n^{\circ} \text{células/mL} = \frac{n^{\circ} \text{células vivas} \times FD \times 10^4}{n^{\circ} \text{cuadrantes}}$$

VIABILIDAD:

$$\text{viabilidad} = \frac{n^{\circ} \text{células vivas}}{n^{\circ} \text{cuadrantes}} \times 100$$

Obtención de PBMCs de sangre periférica y activación de células T.

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se obtuvieron a partir de muestras de sangre de donantes sanos. La sangre total anti-coagulada (10 ml) se diluyó a la mitad en PBS (10 ml), y posteriormente se realizó una separación por centrifugación en gradiente de densidad usando *Ficoll-Paque*®. Se trabajó con un tubo de fondo cónico tipo *Falcon* de 50 ml, en el que inicialmente se añadieron 5 ml de *Ficoll-Paque*® y posteriormente se añadió 5 ml de sangre diluida. Esta adición se realizó lentamente para evitar la alteración de la interfase.

Se centrifugó el tubo de 50 ml durante 20 minutos a 1500 rpm. Al finalizar la centrifugación, se observa como la muestra de sangre se ha dividido en diferentes fases, separando los componentes de la sangre de acuerdo a su densidad. Todos los componentes de la sangre más densos que el *Ficoll-Paque*® (1,078 g/ml) lo atravesarán, mientras que los PBMCs cuya densidad media es de 1,070 g/ml, se dispondrán justo encima del *Ficoll-Paque*®, observándose una banda blanquecina en la interfase entre el plasma y el *Ficoll-Paque*®. El disco de PBMC se recogió cuidadosamente y se dispuso en un tubo con 10 ml de PBS.

Los PBMCs obtenidos se lavaron dos veces en PBS con el objetivo de eliminar los restos de *Ficoll-Paque*®. Finalmente se sembraron en medio RPMI de complementado al 10% de SFB y con una densidad de 1×10^6 cel/ml.

Para la producción de las células T activadas, los PBMC fueron estimulados a lo largo de un día con 5 µg/ml PHA, factor mitógeno de la familia de las lectinas. Tras 24 horas, se eliminó la PHA, y las células se resuspendieron en un medio suplementado con 30 UI/ml de IL-2 y se cultivaron durante 6 días realizando cambios de medio con IL-2 cada 48 horas.

Ensayos de citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad se desarrollaron de la siguiente manera: las células (5×10^4 por pocillo) se sembraron en placas de 96 pocillos con medio completo. Posteriormente eran tratadas con diferentes concentraciones (1-1000 ng/ml) de sTRAIL o LUV-TRAIL, LUVDOX o LUVDOX-TRAIL (64,56-0,09 µM) durante 24 horas.

En los ensayos en los que se estudió la inhibición de la muerte celular a través de la incubación con z-VAD, inhibidor general de las caspasas (30 µM, *Bachem*) y RIK, anticuerpo bloqueante de TRAIL (500 ng/ml, *BD Bioscience*). Los diferentes inhibidores se añadían 1 hora antes de la adición de los distintos tratamientos.

Ensayo de reducción del MTT

El método de *Mosmann* modificado basado en la reducción del MTT (bromuro de dimetilo tiazolitetrazolio) fue utilizado para determinar la viabilidad de los cultivos celulares tras aplicar los distintos tratamientos. Se trata de un método colorimétrico en el que se va a establecer una relación entre los cristales de azul de formazán producidos en la reducción del MTT y el porcentaje de células viables.

Se sembraron 5×10^4 células por pocillo en placas de 96 pocillos y se les aplicó el tratamiento correspondiente, a las siguientes concentraciones: 1000; 333,3; 111,11; 37;

12,4; 4,1 y 1,4 ng/ml para sTRAIL y LUV-TRAIL. Cada punto experimental se realizó por triplicado, y se tomaron como controles células sin tratar y medio completo como blanco.

Después de 24 horas de tratamiento se añadió a cada pocillo 10 µl del reactivo MTT a una concentración inicial de 5 mg/ml en PBS y se incubó a 37°C durante 2 horas. Posteriormente se retiraron 70 µl del sobrenadante tras haber sometido la placa a un pulso de centrifugación y se añadió 100 µl de agente reductor isopropanol ácido (0,05 M HCl), lo que propició que las sales de tetrazolio cambiaran a color azul y precipitaran, quedando adheridas al fondo del pocillo. Tras agitar la placa (*Bioblock*) hasta observar la disolución completa de los cristales, se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas ELISA MR5000 (*Dynatech*).

La absorbancia observada en los controles se tomó como el 100% de viabilidad y para el cálculo de la viabilidad en el resto de los pocillos se estableció una relación porcentual respecto a la observada en el control.

Marcaje con Anexina V.

La cuantificación de la apoptosis se realizó por medio del marcaje con anexina V. La anexina V es una proteína con capacidad para unirse de manera específica a la fosfatidilserina traslocada de la cara interna de la membrana celular a la cara externa durante el proceso de apoptosis.

Tras realizar los diferentes tratamientos durante 24 horas en las placas de 96 pocillos, ésta se centrifugó durante 2 minutos a 4500 rpm. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 µl de anexina-V-DY634 (*Immunostep*), conjugada con alofococianina (APC) en 49 µl del tampón ABB 1x (*Annexin binding buffer*, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, 19 mM HEPES/NaOH, pH 7.4) para obtener una concentración final de anexina V de 1,5 µg/ml en cada pocillo. La incubación de las células con la anexina V se realizó durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Finalmente, se añadieron 200 µl de PBS estéril a la suspensión celular y ésta fue procesada usando el citómetro de flujo *FACSCalibur* y analizada mediante el programa *CellQuest* (*BD Bioscience*).

Marcaje de proteínas de superficie

Para determinar la expresión de los receptores mortales de TRAIL (DR4 y DR5) en la superficie de membrana en estado basal, las células se marcaron con anticuerpos específicos para cada receptor conjugados con ficoeritrina (*BD Bioscience*).

Se tomaron 10⁵ células por punto experimental (control de isotipo, DR4 y DR5), por duplicado. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en una dilución del anticuerpo correspondiente en 100 µl de PBS con 5% de SFB. Las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Tras un lavado de las células con 500 µl de PBS en 5% de SFB las muestras se analizaron mediante citometría de flujo. El control de isotipo consiste en un anticuerpo del mismo isotipo conjugado con ficoeritrina pero que no reconoce ninguna molécula en las células a analizar.

Análisis de proteínas mediante Western blot

La técnica de *Western blot* se realizó en las tres líneas celulares con el objetivo de analizar los niveles de expresión y activación de las principales proteínas implicadas en la vía extrínseca de la apoptosis, caspasa-8, caspasa-3 y sus respectivos sustratos, Bid y PARP-1. Como control de carga se analizó la expresión de β -actina.

Las células se mantuvieron en frascos de cultivo de 75 m^2 hasta obtener 40 ml con una densidad de $8 \times 10^5/ml$. Tras centrifugar y resuspender intensamente las células en 2,4 ml de medio completo, se trasvasaron 225 μl de la muestra a diferentes *Eppendorf* a los que se añadieron de manera secuencial 25 μl de sTRAIL o LUV-TRAIL a una concentración de 12,5 $\mu g/ml$ obteniendo en cada muestra la dosis máxima de 1000 ng/ml tanto de sTRAIL como de LUV-TRAIL. Ambos tratamientos se fueron añadiendo de manera secuencial en la siguiente franja temporal: 6, 4, 2, 1 hora y control (0 horas). Finalmente se tomaron alícuotas para la cuantificación de la apoptosis y se procedió al lisado de las células.

Para la realización del lisado celular, se lavaron inicialmente las células tras centrifugarlas (3 minutos 1500rpm) con PBS para detener la acción de sTRAIL o LUV-TRAIL y se añadieron 50 μl de tampón de lisis (Tritón X-100 al 1% (v/v), 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM EDTA, 10 mM fluoruro de sodio, 1 mM leupeptina, 150 mM cloruro de sodio y glicerol al 10% (v/v)). La disolución resultante se centrifugó 20 minutos a 14.000 rpm y 4°C, posteriormente se recolectaron 40 μl del sobrenadante donde se encontraban las proteínas celulares, y se realizó un ensayo de BCA para cuantificar la cantidad de proteína utilizando el kit *PierceTM BCA Protein Assay (Life Technologies)*.

El ensayo de BCA combina la reducción de Cu^{2+} a Cu^{1+} por proteínas en un medio alcalino y la detección colorimétrica del catión Cu^{1+} con el ácido biciniconímico (BCA). El complejo BCA/ Cu^{1+} es soluble en agua y puede ser medida su absorbancia a 562 nm. El ensayo de BCA permitirá determinar la concentración total de proteína e igualar la cantidad de proteína cargada en cada una de las muestras.

A las muestras se les añadió el tampón de carga 3x (150 mM Tris -HCl pH 7,4, SDS al 3% molibdato de sodio 0,3 mM, 30 mM pirofosfato sódico, 30 mM fluoruro de sodio, glicerol al 30% (v/v), β -mercaptoetanol al 30% (v/v) y azul de bromofenol al 0,06% (p/v)) y se calentaron a 94°C durante 5 minutos.

Las muestras junto con los marcadores de peso molecular se cargaron en un gel de poliacrilamida al 12% con SDS que consta de dos partes, el gel concentrador y el gel de resolución. La composición del gel de concentración fue: acrilamida/bis al 5%, 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, SDS al 0,1%, persulfato amónico al 0,1%, TEMED al 0,01%. La composición del gel de resolución fue: acrilamida/bis 10% o 15% 370 mM Tris-HCl, pH 8,8, SDS al 0,1%, persulfatoamónico 0,1%, TEMED al 0,01%. La composición del tampón de electroforesis fue: 25 mM Tris base, 192 mM glicina y SDS al 0,1%. La electroforesis se llevó a cabo a 80 V y 20 mA durante 10 minutos para que las proteínas atravesasen el gel concentrador y a 180 V y 20 mA durante 75 minutos para que atravesasen el gel de resolución.

Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de PVDF (polivinilo difluorido, *Hybond C-extra, Amersham*) utilizando un tampón de transferencia (48mM Tris-HCl pH 8,3, 3 mM glicina, SDS al 0,037% y metanol al 20%). La transferencia se llevó a cabo en un equipo de transferencia semi-seca (*Hoefler*) a 20 V y 400 mA, durante 1 hora.

Para el análisis de las proteínas se utilizaron anticuerpos específicos que reconocen a cada una de las proteínas mencionadas y anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa que reconocen a los anticuerpos primarios y finalmente se detectaron los inmunocomplejos mediante una reacción quimioluminiscente llevada a cabo por la peroxidasa. En primer lugar, la membrana de PVDF se bloqueó durante 1 hora con leche desnatada en polvo al 5% (p/v), disuelta en PBS y se lavó 3 veces durante 5 minutos con tampón B (0,12 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, tween 20 al 0,1% (p/v) en PBS, pH 7,4). Posteriormente la membrana se incubó con el anticuerpo primario específico (diluido en tampón B con leche desnatada en polvo al 2%) durante 24 horas a 4°C. Los anticuerpos utilizados fueron:

Antígeno//animal en el que se ha generado (casa comercial)

- Caspasa-8//ratón (*BD Pharmingen*)
- Caspasa-3//conejo (*CellSignaling*)
- Bid// cabra (*R&D Systems*)
- PARP1// ratón (*ENZO lifesciences*)
- Actina//ratón (*eBiosciences*)

Tras la incubación, se lavó la membrana tres veces durante 5 minutos en agitación y luego se incubó con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (*Sigma*) diluido en tampón B con leche desnatada en polvo al 2% durante 1 hora. Posteriormente se lavó la membrana otras tres veces y se añadió el sustrato correspondiente.

La detección de los inmunocomplejos se realizó mediante una solución de revelado, preparada en el momento de su utilización, que contenía: 22,5 ml de tampón 0,2 M Tris/HCl, 1 mM MgCl₂, pH 9,6, 2,5 ml de una disolución 1mg/ml de NBT en dimetilformamida y 375 µl de una disolución 4 mg/ml de BCIP en dimetilformamida (todos ellos de *Sigma*). Una vez revelada, la membrana se conservó a 4°C. Los tiempos de revelado dependieron de la cantidad de muestra y de la sensibilidad del anticuerpo primario utilizado.

Análisis estadístico

Para todos los estudios de comparación entre variables cuantitativas se aplicó el test de la *t* de *Student*. Los datos que se muestran corresponden a la media ± desviación estándar típico (SD).

En todos los casos, se consideró como significativamente estadístico un valor de *p* <0,05. Los datos estadísticos fueron analizados usando el programa *Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft)*.

Resultados

Expresión basal de los receptores mortales de TRAIL

Como paso previo al análisis de citotoxicidad inducida por TRAIL, se realizó un estudio de los niveles basales de expresión de los receptores pro-apoptóticos DR4 y DR5 en las tres líneas celulares empleadas en el presente trabajo, MOLT4, Raji y U937 (Anexo figuras: figura 1). Tanto en la línea celular MOLT4 como en la línea celular Raji se observaron altos niveles de expresión del receptor DR5, mientras que el receptor DR4 se expresaba en menor medida, llegando a ser indetectable en las células MOLT4. Por el contrario, en la línea celular U937, se observó una baja expresión del receptor DR5 mientras que la expresión de DR4 fue alta.

Citotoxicidad inducida por TRAIL

El análisis de la capacidad citotóxica de TRAIL se llevó a cabo a través de ensayos dosis respuesta durante 24 horas, en paralelo con TRAIL soluble (sTRAIL) y TRAIL acoplado a liposomas (LUV-TRAIL). Se determinó la viabilidad celular con la realización de un ensayo de reducción del MTT (Anexo Figuras: figura 2) y el porcentaje de muerte celular por apoptosis mediante citometría de flujo tras el marcaje con anexina V (Anexo Figuras: figura 3).

En los estudios de viabilidad celular se observa, de forma estadísticamente significativa, como en las tres líneas celulares, a altas dosis de LUV-TRAIL (> 333,3 ng/ml), el descenso de la viabilidad celular es mayor con respecto al descenso de la viabilidad obtenido de sTRAIL. Los resultados derivados del marcaje de la traslocación de fosfatidilserina con anexina V, corroboran la mayor acción citotóxica de LUV-TRAIL y su mayor capacidad de inducir apoptosis a altas concentraciones comparado con sTRAIL.

Para la línea celular MOLT4, la reducción de la viabilidad a altas concentraciones (1000 ng/ml) llega hasta el 35% para LUV-TRAIL, mientras que para altas concentraciones de sTRAIL, la viabilidad se mantiene entre el 80% (Anexo Figuras: figura 2.A). El porcentaje de células anexina V positivas obtenido a la máxima concentración de LUV-TRAIL (1000 ng/ml) fue de 65,1%, en comparación con el 24,8% obtenido para la misma concentración de sTRAIL. En ambos experimentos la diferencia entre los resultados obtenidos fue estadísticamente significativo a partir de la concentración 111,1 ng/ml de TRAIL (Anexo Figuras: figura 3.A).

Las células Raji presentaron una reducción de la viabilidad hasta valores próximos al 50%, a la máxima concentración de LUV-TRAIL (1000 ng/ml), mientras que el descenso de la viabilidad a la más alta concentración de sTRAIL permaneció en torno al 25% (Anexo Figuras: figura 2.B). Por otro lado, los porcentajes de células anexina V positivas obtenidos, fueron del 46,05% para la máxima concentración de LUV-TRAIL (1000ng/ml) y del 27,1% para sTRAIL. En este caso, únicamente presentó significación estadística el resultado obtenido a la máxima concentración (Anexo Figuras: figura 3.B).

Finalmente en la línea celular U937 se observó una disminución de la viabilidad celular hasta un 20% a la concentración más alta de LUV-TRAIL (1000 ng/ml), mientras que con sTRAIL, la viabilidad se mantuvo próxima al 80% (Anexo Figuras: figura 2.C). El porcentaje de células anexina V positivas para la concentración más alta de LUV-TRAIL (1000 ng/ml) fue del 70,5%. Al emplear sTRAIL a 1000 ng/ml se obtuvo un valor de 20,1%, prácticamente similar a la muerte basal observada en el control (Anexo Figuras:

figura 3.C). En ambos ensayos a partir de la concentración de 111,1 ng/ml de TRAIL se observó significación estadística comparando los resultados obtenidos para sTRAIL y LUV-TRAIL.

Posteriormente se llevaron a cabo experimentos en paralelo para LUV-TRAIL y sTRAIL en presencia y ausencia de z-VAD, inhibidor general de las caspasas y RIK, anticuerpo bloqueante de TRAIL (Anexo Figuras: Figura 4). Los resultados obtenidos muestran como en las tres líneas la presencia de z-VAD o de RIK disminuye la apoptosis hasta los niveles de muerte basal. Además, para las tres líneas existirá significancia estadística entre los resultados de muerte celular de LUV-TRAIL (1000 ng/ml) y los valores obtenidos para LUV-TRAIL (1000 ng/ml) combinado con z-VAD o RIK.

Activación de la apoptosis vía extrínseca por TRAIL

Tras llevar a cabo los ensayos de citotoxicidad con las diferentes formulaciones de TRAIL (sTRAIL y LUV-TRAIL) y observar la mayor capacidad de LUV-TRAIL para inducir la apoptosis, pasamos a analizar mediante *Western blot* la activación de las principales proteínas implicadas en la vía extrínseca de la apoptosis (caspasa-8, caspasa-3 y sus respectivos sustratos Bid y PARP-1). Para ello, se utilizó la dosis máxima de 1000 ng/ml tanto de sTRAIL como de LUV-TRAIL y se fueron añadiendo de manera secuencial a las células durante los tiempos indicados (Anexo Figuras: figura 5). Simultáneamente, alícuotas de las muestras a diferentes tiempos se recogieron y se analizó el porcentaje de células apoptóticas mediante tinción con anexina V.

Cuando las células MOLT4 se trataron con sTRAIL se observó en el ensayo con anexina V como la inducción de la apoptosis en los diferentes tiempos era baja y apenas obteníamos un porcentaje de células anexina positivas del 12,7% (Anexo Figuras: figura 5.D). Estos resultados se correlacionaban con los obtenidos por el *Western Blot*, en los que apenas se observa procesamiento de la pro-caspasa-8 y de la pro-caspasa-3 (aumento discreto de los diferentes fragmentos procesados). En contraposición, el tratamiento con LUV-TRAIL causa una clara activación de ambas caspasas ya a las 2 horas. Además, el procesamiento de las caspasa-8 y de la caspasa-3 es completamente funcional como lo demuestra el procesamiento de sus respectivos sustratos Bid y PARP-1. Adicionalmente, esta activación de las caspasas se correlaciona con la presencia de células anexina V positivas (Anexo Figuras: Figura 5.D).

En los resultados obtenidos para las células Raji se observa también como LUV-TRAIL induce una mayor activación de la caspasa-8, desapareciendo por completo el fragmento de la pro-caspasa-8 a 6 horas, mientras que para sTRAIL, los niveles de pro-caspasa permanecen prácticamente inalterados con el tiempo. Además la activación de las caspasa-8 es funcional al verificar el respectivo procesamiento que se observa en su sustrato Bid. En cuanto a la caspasa-3, los resultados extraídos no permiten distinguir una clara diferencia de activación entre los ensayos con LUV-TRAIL y sTRAIL, existiendo en ambos casos niveles de los fragmentos p19, p17 similares a partir de las 2 horas (Anexo Figuras: figura 5.B). Este hecho se constata al analizar los resultados extraídos del análisis de la muerte celular, donde a las 6 horas, todavía no existe una diferencia acusada entre los valores obtenidos para sTRAIL y LUV-TRAIL (Anexo Figuras: figura 5.E).

Por último, los resultados del *Western blot* para las células U937 también muestran la mayor capacidad de los LUV-TRAIL, en comparación con sTRAIL, de activación de las principales moléculas implicadas en la apoptosis. Mientras que con el tratamiento con sTRAIL no es posible distinguir a ningún tiempo activación de ambas caspasas (caspasa

-8 y -3), con el tratamiento de LUV-TRAIL se observa una ligera disminución de la procaspasa-8 y la aparición del fragmento procesado p19 de la caspasa-3 a partir de las 2h, en consecuencia, observamos un procesamiento de Bid y de PARP-1 (Anexo Figuras: figura 5.C). Los resultados obtenidos paralelamente, en lo referente a la muerte celular mediante la tinción con anexina V, corroboran esta mayor activación de la vía extrínseca con los LUV-TRAIL (Anexo Figuras: figura 5.F).

Potencial citotóxico de LUVDOX-TRAIL

Una vez que se llevó a cabo la producción de los LUVDOX-TRAIL, el siguiente paso fue realizar un estudio de citotoxicidad sobre las correspondientes líneas celulares tumorales hematológicas (MOLT4, Raji y U937).

En primer lugar, se realizaron estudios dosis-respuesta analizando en paralelo la citotoxicidad de LUVDOX-TRAIL y LUVDOX. La dosis más alta corresponde a una concentración de TRAIL de 1000 ng/ml y a una concentración de DOX de 64,56 μ M (Anexo Figuras: figuras 6 A. 6.B. 6.C). En las tres líneas celulares se observó un elevado efecto citotóxico de los LUVDOX-TRAIL, siempre mayor que los LUV-TRAIL. En el caso de los LUVDOX, mientras que en las células MOLT4 la capacidad citotóxica fue similar a la de los LUVDOX-TRAIL, en el caso de las células U937 y sobre todo en las células Raji, los LUVDOX mostraron una citotoxicidad inferior a los LUVDOX-TRAIL. Se determinó reducir la dosis de DOX en los LUVDOX-TRAIL (1/10) y LUV-DOX (1/10) 10 veces (6,456 μ M), (Anexo Figuras: figuras 6.D, 6.E, 6.F).

En las células MOLT4, DOX muestra un elevado efecto pro-apoptótico y en consecuencia tanto LUVDOX como LUVDOX-TRAIL fueron capaces de matar prácticamente el 100% de las células (Anexo Figuras: figura 6A). Al disminuir la concentración de DOX 10 veces, se redujo la capacidad citotóxica de LUVDOX(1/10) y se mantuvo un efecto pro-apoptótico de LUVDOX-TRAIL (1/10) elevado, próximo al 100%, mientras que el de los LUVDOX (1/10) fue de 74,5% a la dosis máxima de DOX (Anexo Figuras: figura 6.D).

En las células Raji, los LUVDOX-TRAIL mostraron un sorprendente efecto pro-apoptótico, siendo capaces de matar casi el 90% de la células. Además, este efecto parece ser dependiente de la presencia de TRAIL, ya que los LUV-DOX, con una muerte del 45%, no mostraron un efecto tan acentuado como en otras líneas celulares (Figura 6B). Este efecto dependiente de TRAIL quedó de manifiesto al disminuir la concentración de DOX en LUVDOX-TRAIL (1/10), consiguiendo mantener un efecto citotóxico próximo al 70% pero disminuyendo casi por completo el proceso pro-apoptótico en LUVDOX (1/10), presentando unos porcentajes de células anexina V positivas de un 24,3%, próximos a la muerte basal de las células (Anexo Figuras: figura 6.E).

Las células U937 presentaron una elevada muerte celular a altas concentraciones de LUVDOX-TRAIL, en torno al 90%, pero este efecto al igual que en las células MOLT4, parecía estar determinado principalmente por DOX ya que los LUVDOX presentaron una citotoxicidad similar a LUVDOX-TRAIL (Anexo Figuras: figura 6.C). Este efecto cambió al disminuir la concentración de DOX. Los LUVDOX-TRAIL (1/10) alcanzaron una citotoxicidad en torno al 85%, similares a los obtenidos para más alta concentración de LUV-TRAIL, pero la actividad pro-apoptótica de LUVDOX (1/10) disminuyó abruptamente. Este hecho permite establecer que la capacidad citotóxica de los LUVDOX-TRAIL (1/10) depende fundamentalmente de la presencia de TRAIL (Anexo Figuras: figura 6.F).

Caracterización de la muerte celular inducida por los LUVDOX-TRAIL (1/10)

Tras comprobar que cuando se disminuye en diez veces la concentración de DOX se observan diferencias en la capacidad citotóxica de los LUVDOX y LUVDOX-TRAIL en algunas de las líneas celulares estudiadas, se analizó si el aumento del efecto pro-apoptótico de los LUVDOX-TRAIL (1/10), también estaba acompañado de un incremento de las características cinéticas de muerte con respecto a LUV-TRAIL y LUVDOX (1/10). Para ello se realizaron ensayos en paralelo de LUVDOX (1/10), LUVDOX-TRAIL (1/10) y LUV-TRAIL y se cuantificaron los niveles de apoptosis a dos tiempos: 6 y 24 horas. (Anexo Figuras: figura 7)

Los resultados obtenidos muestran como el tratamiento con los LUVDOX-TRAIL (1/10) no presenta una cinética de muerte más rápida en ninguna de las 3 líneas celulares, siendo necesario realizar un ensayo de 24 horas, para observar diferencias marcadas en la citotoxicidad entre las diferentes formulaciones utilizadas. Tras 24 horas, se observó diferencias en la citotoxicidad estadísticamente significativas entre LUVDOX-TRAIL (1/10) con LUVDOX (1/10) y LUV-TRAIL respectivamente en todas las líneas. A excepción de la línea MOLT4 donde la diferencia del efecto pro-apoptótico entre LUVDOX-TRAIL (1/10) y LUVDOX (1/10) no fue significativa.

Por otro lado, la muerte celular observada tras 24 horas con las diferentes formulaciones presentó las características morfológicas típicas de una muerte por apoptosis (Anexo Figuras: figura 8).

Para profundizar en la caracterización del efecto pro-apoptótico de LUVDOX-TRAIL (1/10), se analizó la contribución de las caspasas en la muerte inducida por los LUVDOX-TRAIL (1/10). Para ello, las distintas líneas celulares fueron tratadas con LUVDOX (1/10), LUVDOX-TRAIL (1/10), LUV-TRAIL y DOX (1/10) soluble a las máximas concentraciones y en diferentes combinaciones, en presencia y ausencia de z-VAD (inhibidor general de las caspasas), z-IETD (inhibidor específico de la caspasa-8) y RIK, anticuerpo bloqueante de TRAIL (Anexo Figura: figura 9).

En las células MOLT4, DOX en cualquiera de sus formulaciones, tanto como único tratamiento como en combinación con TRAIL produjo una elevada citotoxicidad (Anexo Figuras: figura 9.A). La citotoxicidad producida por DOX fue en parte dependiente de la activación de las caspasas ya que z-VAD fue capaz de revertirla en parte. A pesar de esta participación de las caspasas en la citotoxicidad inducida por las distintas formulaciones en las que estaba presente DOX, el papel de caspasa-8 no parece relevante en dicha citotoxicidad ya que el pre-tratamiento z-IETD, inhibidor específico de la caspasa-8, apenas tuvo efecto en el descenso de la capacidad citotóxica. Del mismo modo, el pre-tratamiento con el anticuerpo bloqueante de TRAIL, RIK no tuvo un importante efecto en el descenso de la citotoxicidad cuando DOX en cualquiera de sus formulaciones está presente en el tratamiento. Hay que destacar que tanto z-IETD como RIK sí que disminuyeron la muerte celular hasta niveles basales cuando las células MOLT4 fueron tratadas con LUV-TRAIL (Anexo Figuras: figura 9.A). Resulta interesante que la citotoxicidad que se obtuvo con los LUV-TRAIL cuando se combinaron con las distintas formulaciones de DOX (LUV-TRAIL+DOX soluble, LUV-TRAIL+LUVDOX y LUVDOX-TRAIL) fue similar.

En el caso de las células Raji, DOX sola (bien en forma soluble o como LUVDOX) no fue capaz de producir una elevada citotoxicidad (Anexo Figuras: figura 9.B) aumentado

ligeramente cuando se combinó DOX soluble con LUV-TRAIL. Sin embargo, el empleo de las formas liposomales de DOX con TRAIL (TRAIL+LUVDOX y LUVDOX-TRAIL) mostraron una elevada y similar capacidad citotóxica. En las células Raji, la muerte producida por las distintas combinaciones fue dependiente de caspasas ya que z-VAD revirtió la citotoxicidad hasta niveles basales en todos los casos. Por último, en las combinaciones en las que se usó TRAIL, el empleo del inhibidor de caspasa-8, z-IETD y del anticuerpo bloqueante de TRAIL, RIK, produjeron también un descenso muy pronunciado de la capacidad citotóxica.

Por último, en las células U937, DOX sola (bien soluble o como LUVDOX) tampoco produjo una elevada citotoxicidad (Anexo Figuras: figura 9.C) aunque en este caso, a diferencia de lo observado en las células Raji, la combinación de DOX soluble con LUV-TRAIL sí que produjo un aumento considerable de la citotoxicidad (Anexo Figuras: figura 9.C) alcanzando valores similares a los obtenidos cuando los LUV-TRAIL se combinaron con las distintas formulaciones de DOX liposomal (LUV-TRAIL+LUVDOX y LUVDOX-TRAIL). Sin embargo, las distintas combinaciones de LUV-TRAIL con DOX sólo aumentaron ligeramente la capacidad citotóxica de éstos con respecto a cuando se emplean solos. La pre-incubación con el inhibidor general de caspasas, z-VAD, descendió en gran medida la capacidad citotóxica de los distintos tratamientos, indicando que la muerte celular observada depende al menos en parte de la activación de las caspasas. Resulta interesante que en aquellas combinaciones en las que estaba presente TRAIL, el pre-tratamiento con RIK revirtió la muerte celular a niveles similares a los obtenidos con z-VAD pero sin embargo el pre-tratamiento con el inhibidor de caspasa-8 z-IETD, bloqueó sólo parcialmente la muerte cuando TRAIL estaba presente en el tratamiento a excepción del tratamiento sólo con LUV-TRAIL donde el bloqueo fue prácticamente completo.

Efecto citotóxico de LUVDOX-TRAIL en PBMCs y en células T activadas humanas normales.

Finalmente, se analizó el efecto de LUV-TRAIL (1000 ng/ml), LUVDOX, LUVDOX-TRAIL y DOX soluble a concentración de DOX tanto de 64,56 μ M como de 6,456 μ M (1/10) sobre PBMCs y células T activadas obtenidas a partir de éstos tras 6 días de activación provenientes de donantes sanos. (Anexo Figuras: figura 10).

Los resultados obtenidos mostraron como LUV-TRAIL carece de un efecto citotóxico significativo tanto en los PBMCs como en las células T activadas. En contraposición, cuando se empleó DOX a altas concentraciones, tanto los LUVDOX, como los LUVDOX-TRAIL y DOX soluble mostraron un potente efecto citotóxico, induciendo un 70% de muerte en PBMCs y un 85% en células T activadas, tras 24 horas de tratamiento (Anexo Figuras: figura 10.A, 10.B, barras negras). Al disminuir las dosis de DOX 10 veces (LUVDOX (1/10), LUVDOX-TRAIL (1/10) y DOX soluble (1/10)) la capacidad para inducir la muerte celular en las células sanguíneas descendió drásticamente, alcanzado unos niveles de citotoxicidad similar a los obtenidos en las células control sin tratar, 18% para los PBMCs y 50% para los linfocitos T activados (Anexo Figuras: figura 10.A, 10.B, barras blancas).

Adicionalmente, se evaluó de manera específica el efecto pro-apoptótico de los diferentes compuestos sobre los linfocitos T activados CD4+ (Anexo Figuras: figura 10.C) y CD8+ (Anexo Figuras: figura 10.D), comprobando que no existían diferencias en la toxicidad entre ambas subpoblaciones linfocitarias.

Discusión

En el presente trabajo se ha analizado la capacidad citotóxica de nuevas formulaciones de TRAIL, basadas en el anclaje de TRAIL a la superficie de nanopartículas lipídicas tipo LUV (LUV-TRAIL) y en la incorporación, en el lumen hidrofóbico del liposoma, de un fármaco extensamente utilizado en la terapia contra el cáncer, la doxorubicina. Los ensayos se realizaron simultáneamente en tres líneas celulares tumorales, procedentes de distintas neoplasias hematológicas humanas, MOLT4, Raji y U937.

Todos los experimentos de citotoxicidad en las tres líneas, mostraron de manera estadísticamente significativa la mayor capacidad de LUV-TRAIL para inducir la muerte celular mediada por este ligando en comparación con la forma soluble de TRAIL. Con los resultados obtenidos en estas 3 líneas se corroboran las posibilidades, ya observadas anteriormente, de utilizar LUV-TRAIL como una buena opción para sensibilizar líneas celulares resistentes a la muerte celular inducida por TRAIL soluble (De Miguel et al., 2013. Nair et al., 2015).

La pre-incubación de las 3 líneas celulares en presencia de z-VAD, inhibidor general de las caspasas y RIK, anticuerpo bloqueante de TRAIL, antes de los tratamientos con TRAIL soluble y LUV-TRAIL, determinó como la muerte celular producida era dependiente de la unión de TRAIL a sus receptores y la activación de la apoptosis mediada por caspasas, ya que en presencia de RIK y z-VAD respectivamente, los porcentajes de muerte observados se reducían a niveles basales.

Las razones moleculares en las que subyace esta mayor capacidad de inducir la muerte celular por parte de los LUV-TRAIL, radican en la mayor capacidad de los LUV-TRAIL para inducir la oligomerización y la clusterización de los receptores. (De Miguel et al., 2015), siendo capaces de aumentar la concentración local de trímeros de receptores de TRAIL entrecruzados, que activarán la formación de plataformas supra-moleculares (mayor reclutamiento de DISC), favoreciendo el reclutamiento y la activación más potente de las caspasas. Esta necesidad de un nivel de clusterización superior entre los receptores, para la correcta activación de los mismos, ya había sido descrita previamente en otros miembros de la familia de los receptores del TNF (O'Reilly et al., 2009). Respecto a esto, la contribución relativa de cada uno de los ligandos de muerte DR4 y DR5, a la muerte dependiente de ligando, se mantiene como objeto de debate y parece depender del tipo celular. A partir de los resultados derivados de los niveles de expresión y la citotoxicidad de TRAIL en las 3 líneas celulares, parece no existir una relación directa entre la expresión diferencial de DR5 o DR4 y la capacidad de TRAIL para inducir la apoptosis en cada una de las líneas.

El análisis por *Western blot* de la activación de las principales proteínas implicadas en la vía extrínseca de la apoptosis (caspasa-8, caspasa-3 y sus respectivos sustratos Bid y PARP-1) a tiempos relativamente cortos, permite evidenciar como los LUV-TRAIL, no sólo fueron capaces de activar las caspasas de manera más eficiente sino también de manera más rápida, presentando una cinética de activación de las caspasas más rápida que TRAIL soluble en las tres líneas celulares. Aunque la activación de las caspasas por LUV-TRAIL tiene lugar en las 3 líneas celulares, la apoptosis inducida en cada una de las líneas celulares es diferente. Entre las características individuales que diferenciarán la respuesta de las líneas celulares a LUV-TRAIL se encuentran: el nivel de expresión de caspasa-8 (y de las caspasas en general), el control de la acción de DISC a través de diferentes modificaciones post-traduccionales y la dependencia o no de la amplificación de la señal de muerte por la vía mitocondrial que conlleva la

clasificación de las células en tipo I, si la caspasa-8 es capaz de inducir de manera directa la activación de las caspasas efectoras o de tipo II si necesita la amplificación de la señal de muerte a través de la vía mitocondrial por medio de la activación de la proteína sólo *BH3 Bid*.

Mientras que en las MOLT4 y en las células U937 la activación de la caspasa-8 va a acabar desencadenando una activación de la caspasa-3, y unos niveles de muerte celular relativamente altos ($\approx 70\%$), en las células Raji, la activación de la caspasa-8, no desencadenará una intensa activación de la caspasa-3 y los niveles de muerte celular se verán reducidos, presentando cierta resistencia a la acción de LUV-TRAIL. Este hecho, parece ser debido a una baja concentración de la caspasa-8, que no será capaz de activar por sí sola a la caspasa-3, indicando que esta línea celular es de tipo II. Aunque la vía mitocondrial se pueda llegar a activar ya que se observa el procesamiento de t-Bid, alteraciones en el equilibrio de las proteínas pro- y anti-apoptóticas podrán impedir la correcta activación de la vía mitocondrial en esta línea celular.

Una vez evaluada la mayor capacidad citotóxica de LUV-TRAIL frente a TRAIL soluble, se persiguió aumentar la capacidad citotóxica de LUV-TRAIL, aprovechando las características intrínsecas de los liposomas para realizar la encapsulación de fármacos. Las razones que llevaron a la elección de la doxorubicina como fármaco para incorporarse a los LUV-TRAIL fueron las siguientes: i) el empleo de doxorubicina encapsulada como tratamiento tumoral se lleva desarrollando desde hace más de 20 años y existe mucha información acerca de la preparación y caracterización del fármaco en la literatura. ii) la encapsulación de la doxorubicina era compatible con la fijación de TRAIL soluble a la superficie de los liposomas, y ambos procesos (encapsulación y fijación) se pueden combinar fácilmente y iii) en estudios anteriores se había descrito la existencia de un efecto sinérgico de doxorubicina con TRAIL cuando se administraban en paralelo (Bae et al., 2012).

En una primera aproximación, se llevaron a cabo los experimentos con doxorubicina a altas concentraciones. La elección de esta concentración se basó en investigaciones anteriores del grupo, en las que se había observado una importante acción sinérgica de LUVDOX-TRAIL en líneas celulares humanas provenientes de diversos cánceres de origen epitelial (De Miguel, resultados no publicados). El tratamiento de las líneas celulares tumorales hematológicas empleadas en el presente trabajo con los LUVDOX-TRAIL a esa concentración elevada de doxorubicina, constató unos altos niveles de muerte celular pero dependientes principalmente de la alta acción citotóxica de la doxorubicina en las células, presentando LUVDOX-TRAIL y LUVDOX unos valores de muerte celular similares en las líneas tumorales analizadas (MOLT4, Raji y U937), apuntando a la alta capacidad de los LUVDOX para atravesar la membrana celular de las células tumorales hematológicas y llevar a cabo su acción citotóxica en el núcleo.

Debido a que la doxorubicina tiene importantes efectos adversos, se buscó aprovechar la combinación existente de fármacos en los LUVDOX-TRAIL para disminuir la concentración de doxorubicina, manteniendo altos niveles de muerte celular en las tres líneas. A partir de los datos obtenidos de las curvas de dosis-respuesta a altas concentraciones de doxorubicina en las tres líneas celulares, se consideró disminuir la concentración de doxorubicina en 10 veces, manteniendo la misma concentración de TRAIL (LUVDOX-TRAIL (1/10)). De este modo, se pretendía conseguir un efecto aditivo/sinérgico de TRAIL y doxorubicina pero con una concentración potencialmente mucho menos tóxica de ésta última.

Los resultados mostraron una mayor variabilidad en la respuesta frente a LUVDOX (1/10). Mientras que en las células MOLT4 seguían siendo capaces de inducir la apoptosis en un porcentaje elevado de células, en las células U937 y Raji la capacidad citotóxica de los LUVDOX (1/10) descendía a niveles basales. Por otro lado a pesar de la variabilidad de respuesta tanto a TRAIL como a la doxorubicina entre las diferentes líneas, la utilización de LUVDOX-TRAIL (1/10) permitía obtener un efecto citotóxico elevado en las diferentes líneas (superior al 80%). Aunque en estos ensayos no se observó un efecto claramente superior de los LUVDOX-TRAIL (1/10) en comparación con los LUV-TRAIL en las células U937, la adición de los efectos de ambos fármacos (TRAIL y doxorubicina) en forma de LUVDOX-TRAIL (1/10) fue claramente superior en las células Raji y sobre todo en las células MOLT4 cuando se comparó con la actividad citotóxica de los LUV-TRAIL.

Este efecto superior de los LUVDOX-TRAIL (1/10) puede explicarse por diversos mecanismos. Por una parte, la activación de la vía intrínseca de la apoptosis por la doxorubicina junto con la activación de la vía extrínseca por parte de la unión de TRAIL a su receptor permitirán que tenga lugar el efecto aditivo, concurriendo en una más intensa activación de la caspasa-3 y por tanto en una mayor muerte celular. Por otro lado, también se ha descrito como la doxorubicina puede ocasionar un efecto sinérgico con TRAIL, al favorecer el aumento de los niveles de DR4 y DR5 y disminuir la expresión de la proteína anti-apoptótica c-FLIP (Bae et al, 2012), lo que justificaría también la mayor acción citotóxica de LUVDOX-TRAIL (1/10) en comparación con LUV-TRAIL.

Analizando los mecanismos moleculares implicados en la muerte inducida por los LUVDOX-TRAIL (1/10), la participación de las caspasas sigue siendo necesaria en este nuevo escenario, aunque en todas las líneas celulares se observó como la incubación con z-VAD no inhibía completamente la muerte inducida por los LUVDOX-TRAIL (1/10), lo que indica que es posible que otros tipos de muerte celular pudieran estar implicados.

La necroptosis, es un tipo de muerte celular inducida por ligandos de la familia de TNF en condiciones en las que las caspasas estaban inhibidas (Vandenabeele P et al., 2010). La necroptosis se caracteriza principalmente por la formación de un complejo denominado necroptosoma en el que participan proteínas como RIPK1, RIPK3, FADD y el heterodímero FLIP-caspasa-8. Este fenómeno de necroptosis podría estar detrás de esta muerte celular en presencia de inhibidores de caspasas, aunque hay evidencias bibliográficas de la capacidad de la doxorubicina de favorecer la formación del necroptosoma en presencia de caspasa-8 inactiva (Matt et al., 2015), los mecanismos de interconexión de la apoptosis vía intrínseca y la necroptosis se desconocen. En nuestro caso necesitaríamos profundizar en este proceso utilizando un inhibidor específico de la necroptosis como necrostatina-1 para determinar la verdadera implicación de la necroptosis en el mecanismo de muerte celular observado.

Por otra parte, el empleo de RIK (anticuerpo bloqueante de TRAIL) y de z-IETD (inhibidor de la caspasa-8), tenía como objetivo estudiar la implicación de TRAIL y la activación de la vía extrínseca de la apoptosis en el mecanismo de muerte inducido por los LUVDOX-TRAIL (1/10). A pesar de que en las tres líneas celulares los LUVDOX-TRAIL (1/10) mostraron un elevado potencial citotóxico, los resultados obtenidos con z-IETD y RIK ponen de manifiesto el diferente comportamiento desde el punto de vista mecanístico de cada tipo celular.

En las células MOLT4, los resultados obtenidos con z-IETD y RIK indican que la participación en la muerte celular inducida por los LUVDOX-TRAIL (1/10) aunque parcialmente dependiente de caspasas, la contribución de la activación de la caspasa-

8 por TRAIL contribuye en un pequeño porcentaje. Tal y como se ha comentado anteriormente, probablemente otros tipos de muerte celular inducidos por TRAIL y/o doxorubicina podrían estar implicados.

En las células Raji, la muerte dependiente de caspasas observada se puede atribuir en su totalidad a la activación de la caspasa-8 a través de la vía extrínseca de la apoptosis y esta activación es dependiente de TRAIL ya que tanto z-IETD como RIK inhiben la citotoxicidad de los LUVDOX-TRAIL (1/10) a niveles similares a los conseguidos con z-VAD. Sin embargo, en el caso de las células U937, aunque el anticuerpo bloqueante de TRAIL, RIK, revirtió la muerte celular a niveles similares que z-VAD, el inhibidor específico de la caspasa-8, z-IETD, siguió presentando altos niveles de muerte celular, esto parece indicar que aunque la muerte celular observada es dependiente de caspasas, la iniciación de la cascada apoptótica no parece depender de caspasa-8, pudiendo existir una mayor implicación de la caspasa-10 en la iniciación del proceso apoptótico u otros mecanismos moleculares alternativos que sería interesante analizar en estudios posteriores.

En cualquier caso, aunque los mecanismos de muerte celular pueden ser distintos según el tipo celular y deben ser estudiados con mayor profundidad en futuros estudios, el potencial citotóxico de los LUVDOX-TRAIL (1/10) resulta de gran interés. En todas las líneas celulares estudiadas, la capacidad citotóxica inducida por los LUVDOX-TRAIL (1/10) fue al menos similar a la combinación de LUVDOX (1/10) más LUV-TRAIL, aunque el hecho de administrar los dos fármacos en una misma combinación puede tener ventajas respecto a su administración por separado.

Por último, los resultados derivados del análisis de la toxicidad en PBMCs y linfocitos T activos, refuerzan el potencial de los LUVDOX-TRAIL (1/10), ofreciendo una ventana terapéutica para el empleo de los mismos. La toxicidad hematológica de LUVDOX-TRAIL (1/10) disminuye bruscamente en comparación con los LUVDOX-TRAIL, pero su capacidad para inducir la muerte celular en las células tumorales se mantiene elevada. Aunque se podría variar dentro de un rango la concentración de doxorubicina encapsulada en función de la sensibilidad de la célula tumoral al fármaco, la capacidad citotóxica de los LUVDOX-TRAIL (1/10) descrita a lo largo del trabajo y su baja toxicidad en PBMCs y linfocitos T activados, los convierten en una alternativa interesante dentro de las nuevas formulaciones de nanopartículas lipídicas funcionalizadas con capacidad citotóxica como tratamiento anti-tumoral.

Conclusiones

Las conclusiones obtenidas en el presente trabajo de fin de grado son las siguientes:

1. Se han generado liposomas tipo LUV con TRAIL recombinante anclado en su superficies (LUV-TRAIL) con una capacidad citotóxica sobre las líneas tumorales hematológicas (MOLT4, Raji y U937) mayor que TRAIL soluble.
2. El mecanismo de muerte inducido por LUV-TRAIL es dependiente de la activación por parte de TRAIL de las caspasas, presentando una activación mayor de la apoptosis vía extrínseca y una cinética más rápida que TRAIL soluble.
3. Se han generado LUV-TRAIL con doxorubicina encapsulada en el interior con dos concentraciones distintas de doxorubicina (LUVDOX-TRAIL y LUVDOX-TRAIL (1/10)) que presentan una mayor capacidad citotóxica sobre las líneas tumorales hematológicas (MOLT4, Raji y U937) que LUV-TRAIL.
4. El mecanismo de acción de los LUVDOX-TRAIL (1/10) en las 3 líneas celulares es en parte dependiente de la activación de las caspasas, aunque el empleo de inhibidores de la apoptosis indica la existencia de distintos mecanismos de muerte dependiendo del tipo celular.
5. Los LUVDOX-TRAIL (1/10) ofrece una ventana terapéutica interesante para el tratamiento de neoplasias hematológicas, sin ocasionar toxicidad en PBMCs y linfocitos T activados normales.

Conclusions

The conclusions obtained in this final project are:

1. It has been generated LUV liposomes with the death ligand TRAIL attached to the surface (LUV-TRAIL) with higher cytotoxicity ability than soluble TRAIL in the three haematological tumour cell lines (MOLT4, Raji y U937).
2. The cell death induced by LUV-TRAIL was a caspase-dependant process. The kinetics and the strength of apoptosis activation were higher in LUV-TRAIL than in soluble TRAIL.
3. It has been generated LUV-TRAIL with doxorubicin encapsulated at two different concentrations (LUVDOX-TRAIL y LUVDOX-TRAIL (1/10)) which show a higher cytotoxicity than LUV-TRAIL in the three haematological tumour cell lines (MOLT4, Raji y U937).
4. Cell death induced by LUVDOX-TRAIL (1/10) was due in part to a caspase-dependant process but the use of apoptosis inhibitors could reveal the existence of different cell death mechanism.
5. LUVDOX-TRAIL (1/10) offer an interesting therapeutic window for treatment of haematological malignancies, without causing toxicity in normal PBMCs and T lymphocytes.

BIBLIOGRAFÍA

- Bae S, Ma K, Kim TH, *et. al.* **2012**. Doxorubicin-loaded human serum albumin nanoparticles surface-modified with TNF-related apoptosis-inducing ligand and transferrin for targeting multiple tumor types. *Biomaterials*. 33(5):1536-46.
- Davis ME, Chen ZG, Shin DM. **2008**. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 7(9):771-82
- De Miguel D, Basáñez G, Sánchez D, *et. al.* **2013**. Liposomes decorated with Apo2L/TRAIL overcome chemoresistance of human hematologic tumor Cells. *Mol Pharm*. 10(3):893-904
- De Miguel D, Gallego-Lleyda A, Anel A, *et. al.* **2015**. Liposome-bound TRAIL induces superior DR5 clustering and enhanced DISC recruitment in histiocytic lymphoma U937 cells. *Leuk Res*. 39(6):657-66.
- De Miguel D, Gallego-Lleyda A, Galan-Malo P, *et. al.* **2015**. 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*. 17(8):657-67.
- De Miguel D, Lemke J, Anel A, *et. al.* **2016**. Onto better TRAILs for cancer treatment. *Cell Death Differ*. 23(5):733-747
- Fang J, Nakamura H, Maeda H. **2011**. 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*. 63(3):136-51.
- Lemke J, von Karstedt S, Zinngrebe J, *et. al.* **2014**. Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell Death Differ*. 21(9):1350-64
- Martínez-Lorenzo MJ, Anel A, Gamen S, *et. al.* **1999**. Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *J Immunol*. 63(3):1274-81
- Martinez-Lostao L, García-Alvarez F, Basáñez G, *et. al.* **2010**. Liposome-bound APO2L/TRAIL is an effective treatment in a rabbit model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 62(8):2272-82.
- Martinez-Lostao L, Marzo I, Anel A, *et. al.* **2012**. Targeting the Apo2L/TRAIL system for the therapy of autoimmune diseases and cancer. *Biochem Pharmacol*. 83(11):1475-83.
- Martinez-Lostao L, de Miguel D, Gallego-Lleyda, *et. al.* **2015**. Death ligands and granulysin: mechanism of tumor cell death inducing and therapeutic opportunities. *Immunotherapy*. 7(8):883-2.
- Matt S, Hoffman TG. **2016**. The damage-induced cell death response: a roadmap to kill cancer cells. *Cell Mol Life Sci*. 73(11-12):2183-93
- Micheau O, Shirley S, Dufour F. **2013**. Death receptors as targets in cancer. *Br J Pharmacol*. 169(8):1723-44.
- Nair PM, Flores H, Gogineni A, *et. al.* **2015**. Enhancing the antitumor efficacy of a cell-surface death ligand by covalent membrane display. *Proc Natl Acad Sci*. 112(18):5679-5684.
- Newson-Davis T, Prieske S, Walczak, H. **2009**. Is TRAIL the holy grail of cancer therapy?. *Apoptosis*. 14(4):607-623.
- O'Reilly LA, Tai L, Lee L, *et. al.* **2009**. Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis. *Nature*. 461(7264):659-63.
- Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, *et. al.* **1996**. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem*. 271(22):12687-12690.
- Russo M, Mupo A, Spagnuolo C, *et. al.* **2010**. Exploring death receptor pathways as selective targets in cancer therapy. *Biochem Pharmacol*. 80(5):674-82.
- Sedger LM, McDermott MF. **2014**. TNF and TNF-receptors: From mediator of cell death and inflammation to therapeutic giants-past, present and future. *Cytokine Growth Factors Rev*. 25(4):453-472.
- Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. **2015**. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ*. 22(4), 526-539.
- Tahover E, Patil YP, Gabizon AA. **2015**. Emerging delivery systems to reduce doxorubicin cardiotoxicity and improve therapeutic index: focus on liposomes. *Anticancer Drugs*. 26(3):241-58.
- Taylor R, Cullen SP, Martin S. **2008**. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9(3): 231-241.
- Vandenabeele P, Galluzi L, Kroener G. **2010**. Molecular mechanism of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11(10):700-714.
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, *et. al.* **1995**. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*. 3(6):673-682.