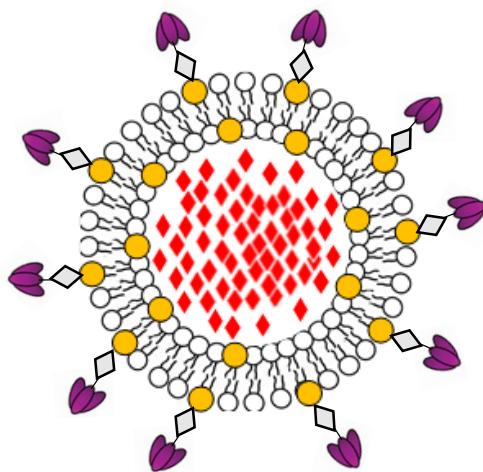


Trabajo de Fin de Grado:
ANEXO FIGURAS

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



Autor:

Javier Plou Izquierdo

Directores:

Luis Martínez Lostao

Diego de Miguel Samaniego

Figura 1.

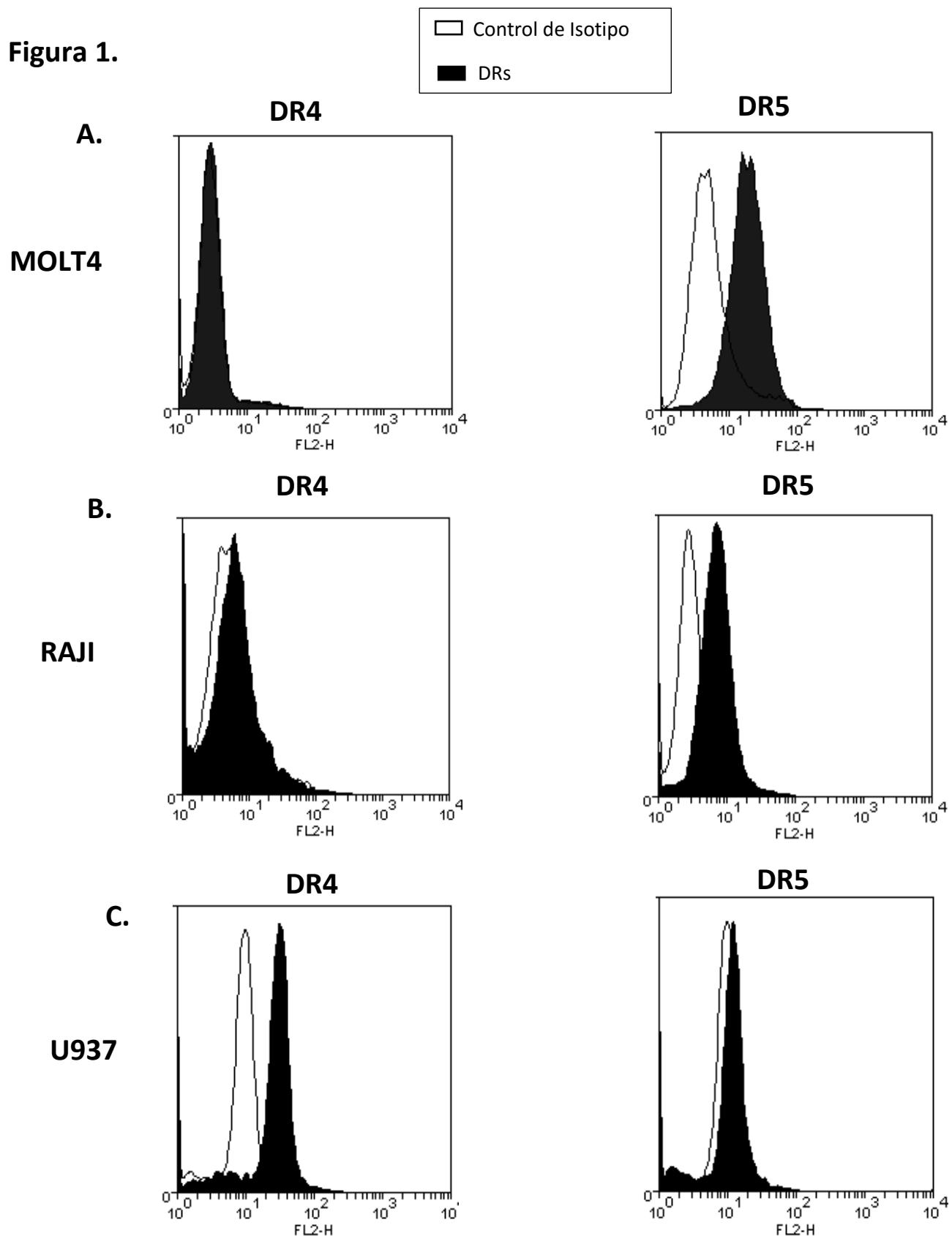


Figura 1. Expresión de los receptores de TRAIL en las líneas celulares de MOLT4, RAJI y U937: Se tomaron 3 muestras de 100.000 células de cada una de las líneas celulares y se incubaron junto con los anticuerpos correspondientes (anti-DR4, anti-DR5 y control de isotipo) diluidos en 100 µL de PBS con un 5% de SFB durante 30 minutos. Luego, las células se lavaron dos veces con PBS con 5% de SFB y se analizó la expresión de DR4 y DR5 mediante citometría de flujo. **A)** Expresión de los receptores DR4 y DR5 en MOLT4. **B)** Expresión de los receptores DR4 y DR5 en Raji. **C)** Expresión de los receptores DR4 y DR5 en U937.

Figura 2.

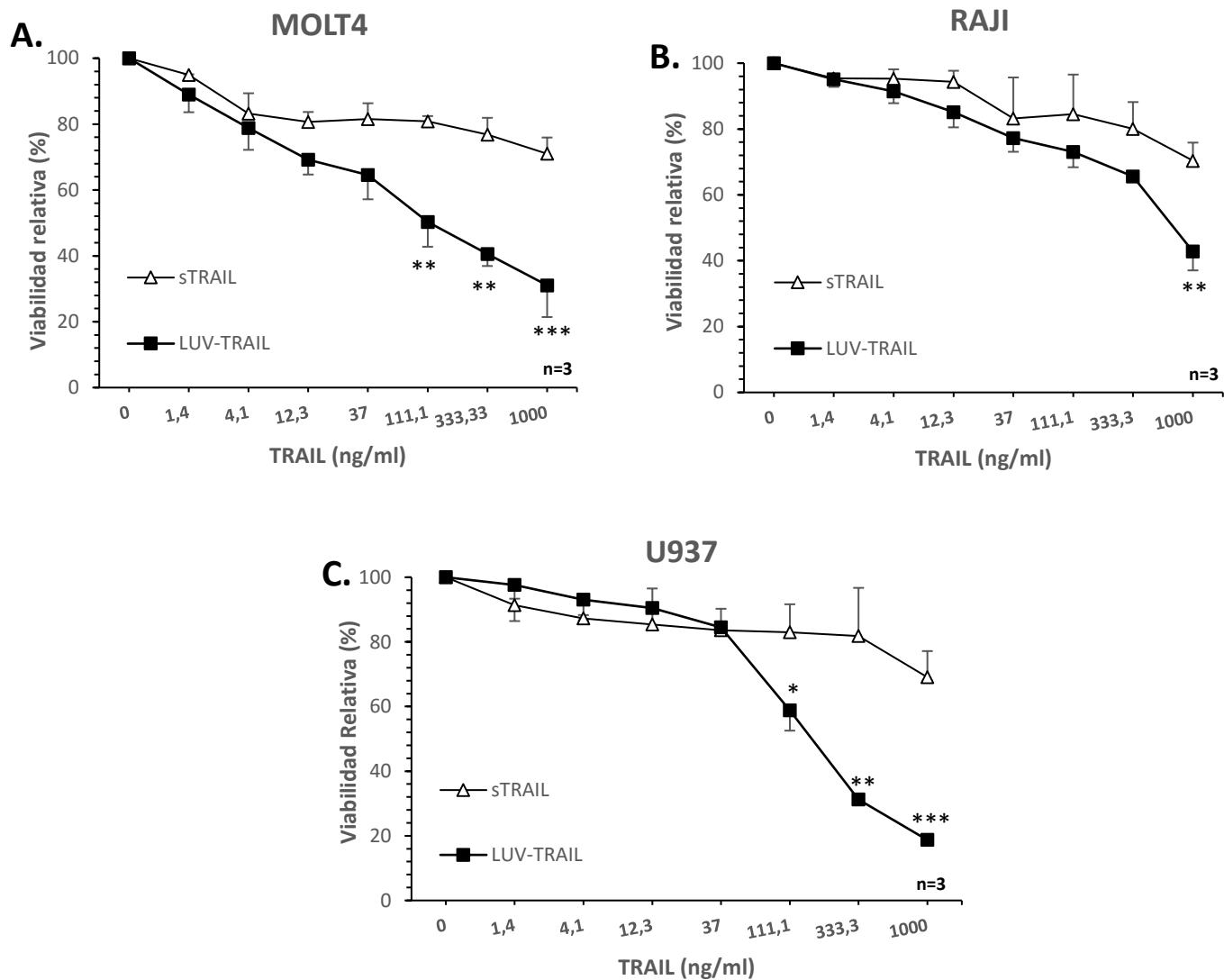


Figura 2. Ensayos de la disminución de la viabilidad mediante la técnica de reducción del MTT. Se realizaron ensayos dosis-respuesta, mediante la técnica de reducción del MTT, incubando las células (5×10^5 cel/ml) durante 24 horas con las correspondientes dosis de TRAIL soluble (sTRAIL) y liposomas decorados con TRAIL (LUV-TRAIL). Los gráficos representan el % de viabilidad relativa en: A) MOLT4. B) Raji. C) U937.

En las tres gráficas la curva representa la media de los experimentos realizados con la desviación estándar de los 3 experimentos analizados. La significación estadística se consideró con valores de * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,005$.

Figura 3.

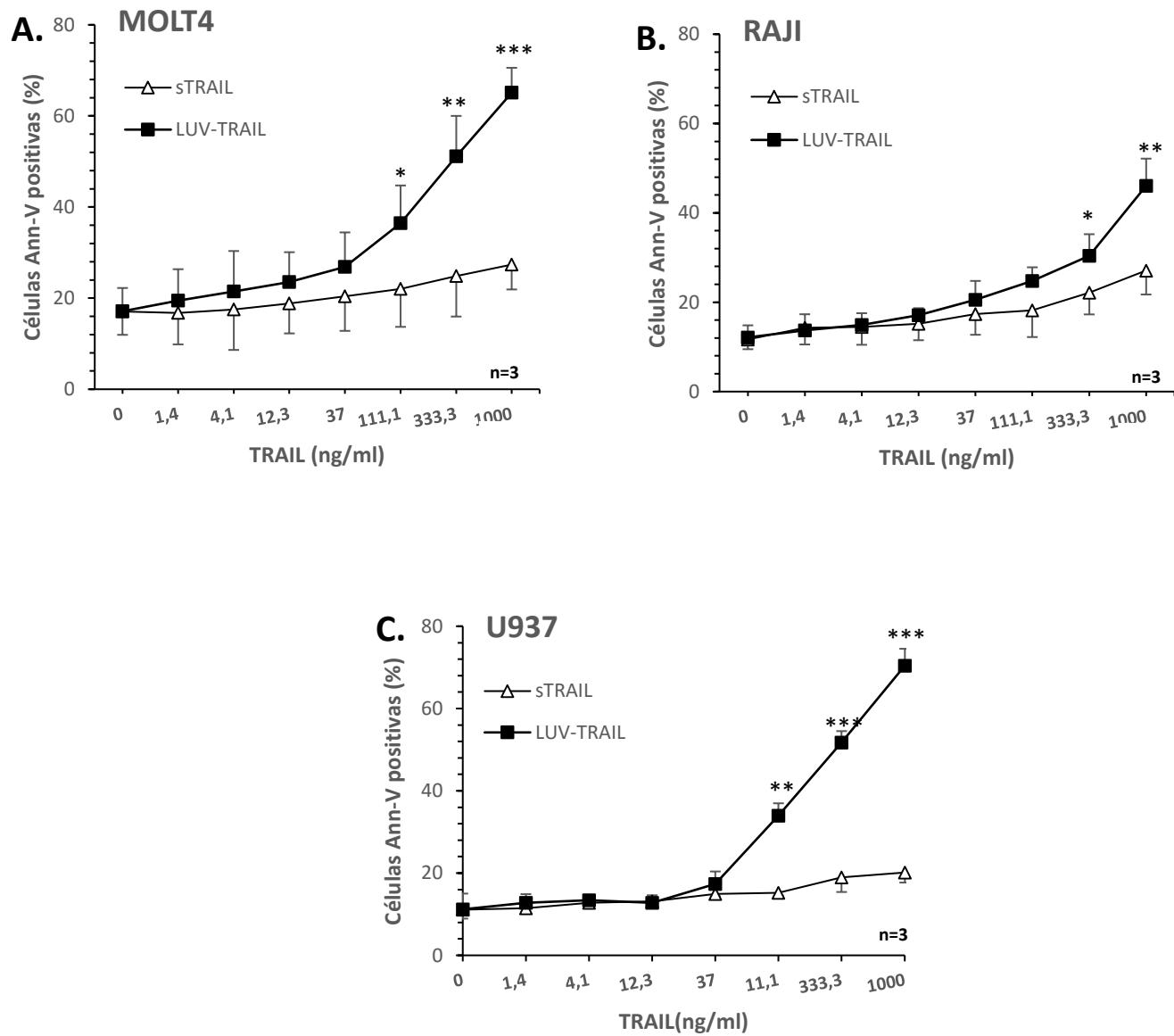


Figura 3. Ensayos de citotoxicidad con liposomas decorados con TRAIL. Se realizaron ensayos dosis-respuesta, analizando la muerte celular por apoptosis mediante la incubación con anexina V y el análisis posterior con el citómetro de flujo. Las células se incubaron durante 24 horas con las correspondientes dosis de TRAIL soluble (sTRAIL) y liposomas decorados con TRAIL (LUV-TRAIL). Las gráficas muestran el porcentaje de células anexina V positivas obtenido tras el análisis mediante citometría de flujo en: A) MOLT4. B) Raji. C) U937.

En las tres gráficas la curva representa la media de los experimentos realizados con la desviación estándar de los 3 experimentos analizados. La significación estadística se consideró con valores de * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,005$.

Figura 4.

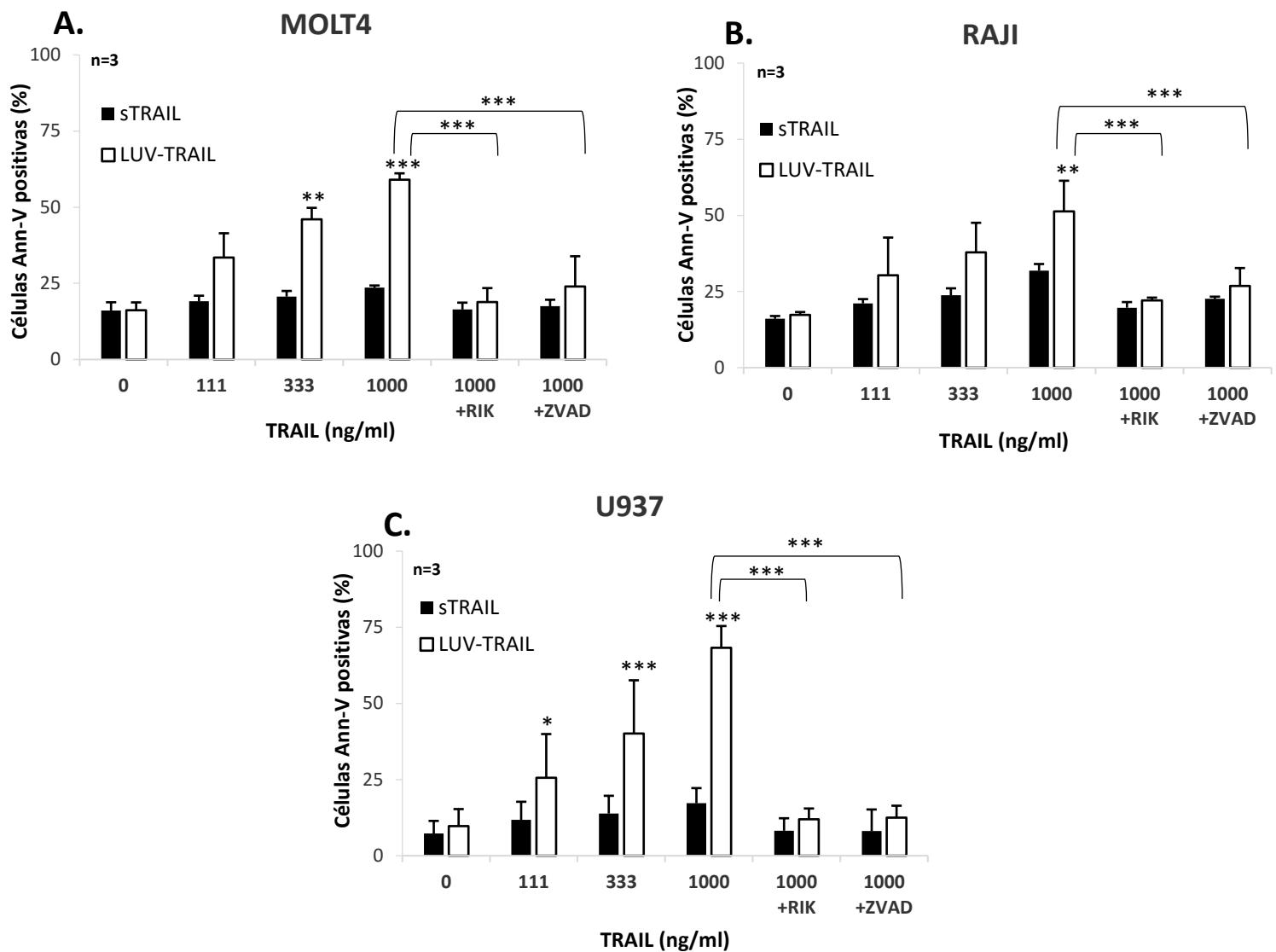
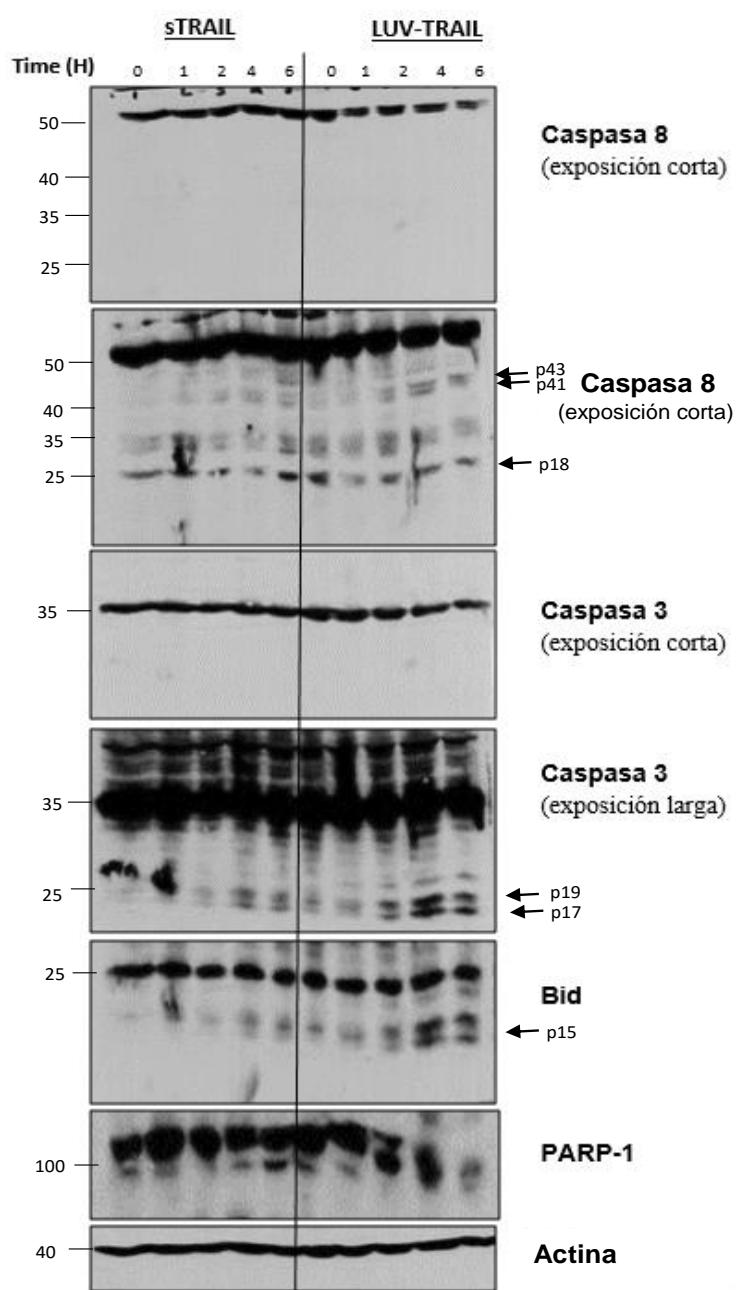


Figura 4. Determinación de los mecanismos de muerte celular de LUV-TRAIL mediante la presencia de z-VAD, inhibidor general de caspasas, y de RIK, anticuerpo bloqueante de TRAIL. Las células se pre-incubaron durante 1 hora por un lado con el anticuerpo monoclonal bloqueante de TRAIL, RIK a una concentración 2,5 µg/ml y por otro con el inhibidor general de las caspasas, z-VAD a una concentración de 30 µM. Posteriormente se incubaron durante 24 horas con una dosis de 1000 ng/ml de TRAIL soluble (sTRAIL) y de LUV-TRAIL. Las gráficas muestran el porcentaje de células anexina V positivas tras el análisis en el citómetro de flujo en: **A) MOLT4. B) Raji. C) U937.**

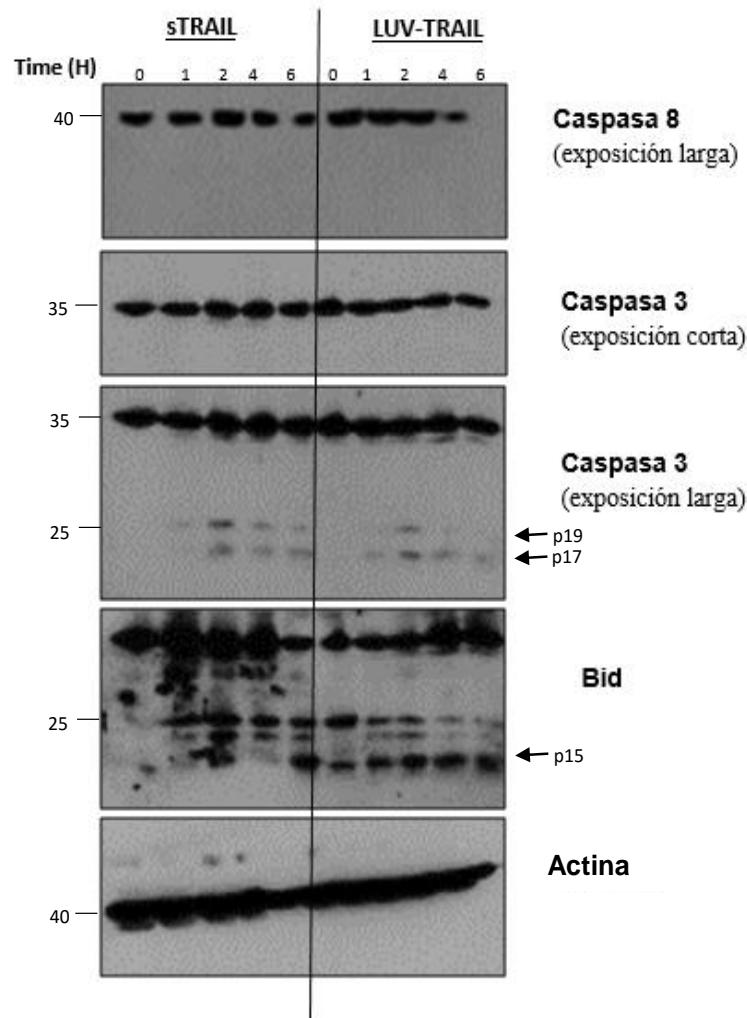
En las tres gráficas cada barra representa la media de los experimentos realizados con la desviación estándar de los 3 experimentos analizados. La significación estadística se consideró con valores de * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,005$.

Figura 5.

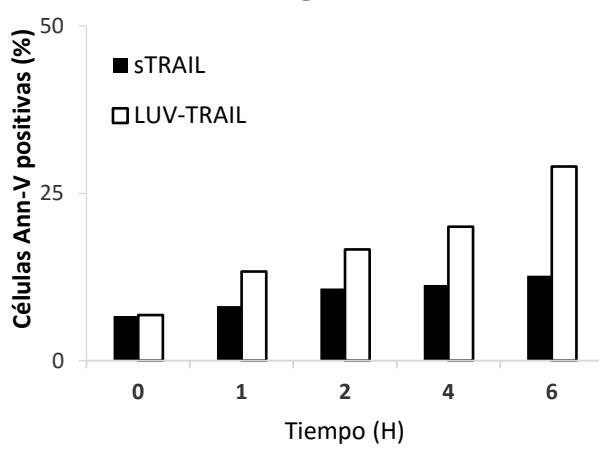
A. MOLT4



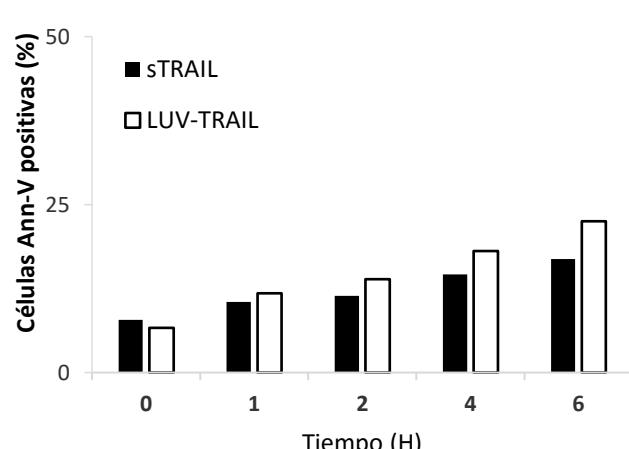
B. RAJI



D. MOLT4



E. RAJI



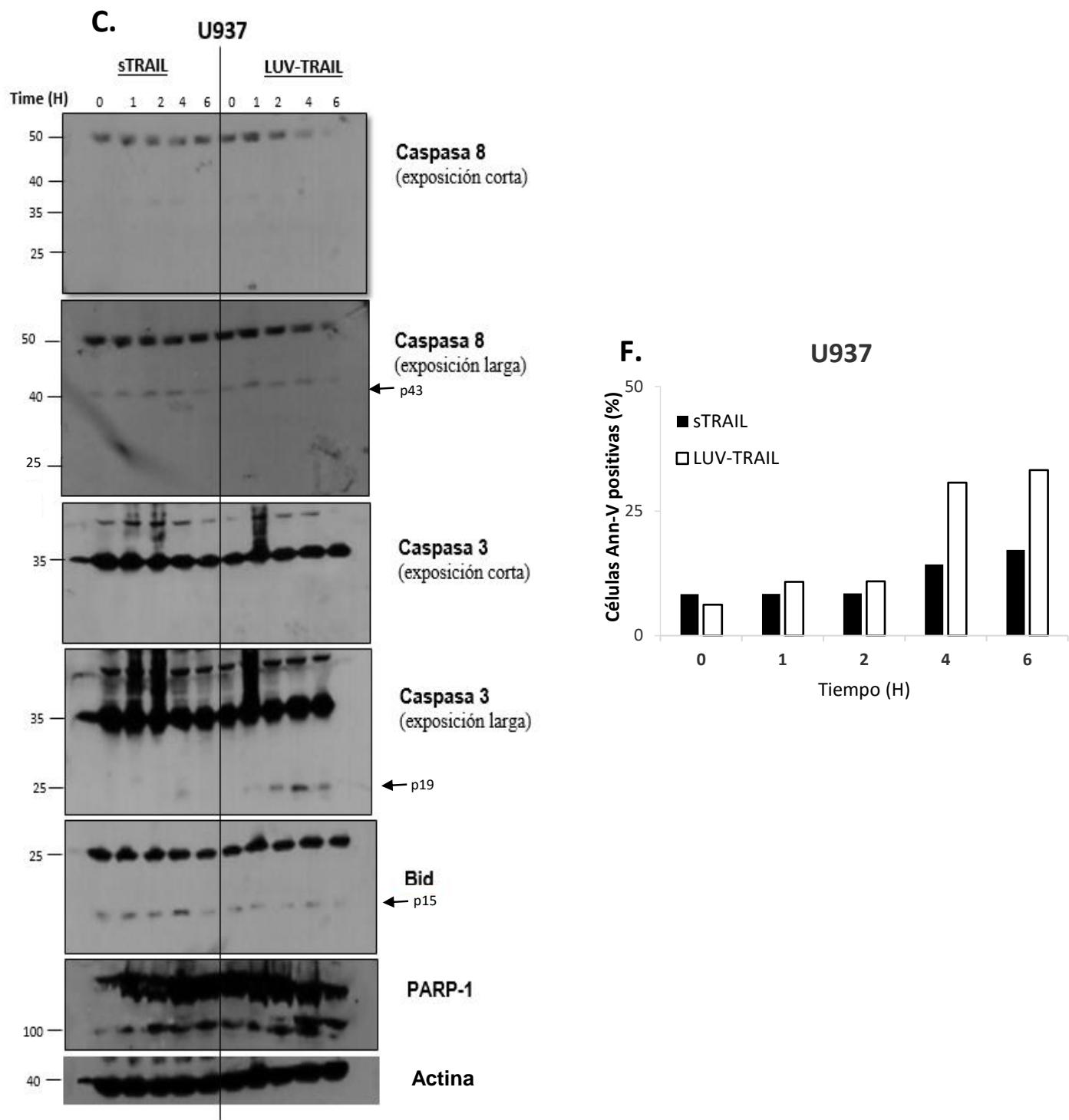


Figura.5 Activación de las caspasas inducida por TRAIL soluble y LUV-TRAIL. Las células se trataron con TRAIL soluble (sTRAIL) o liposomas con TRAIL (LUV-TRAIL) a una concentración de 1000 ng/ml, durante los tiempos indicados (0, 1, 2, 4, 6h). Tras el tratamiento con TRAIL (sTRAIL o LUV-TRAIL), se tomaron dos alícuotas de cada muestra.

En la primera alícuota, se lisaron las células, y tras realizar una separación por SDS-PAGE, se analizaron por *Western blot* los niveles de caspasa-8, caspasa-3, Bid y PARP-1. Los niveles de β -actina se utilizaron como control de la proteína cargada. **A)** MOLT4. **B)** Raji. **C)** U937.

La segunda alícuota fue utilizada para analizar el efecto pro-apoptótico de sTRAIL y LUV-TRAIL mediante citometría de flujo analizando el porcentaje de células anexina V positivas. **D)** MOLT4. **E)** Raji. **F)** U937.

Figura 6.

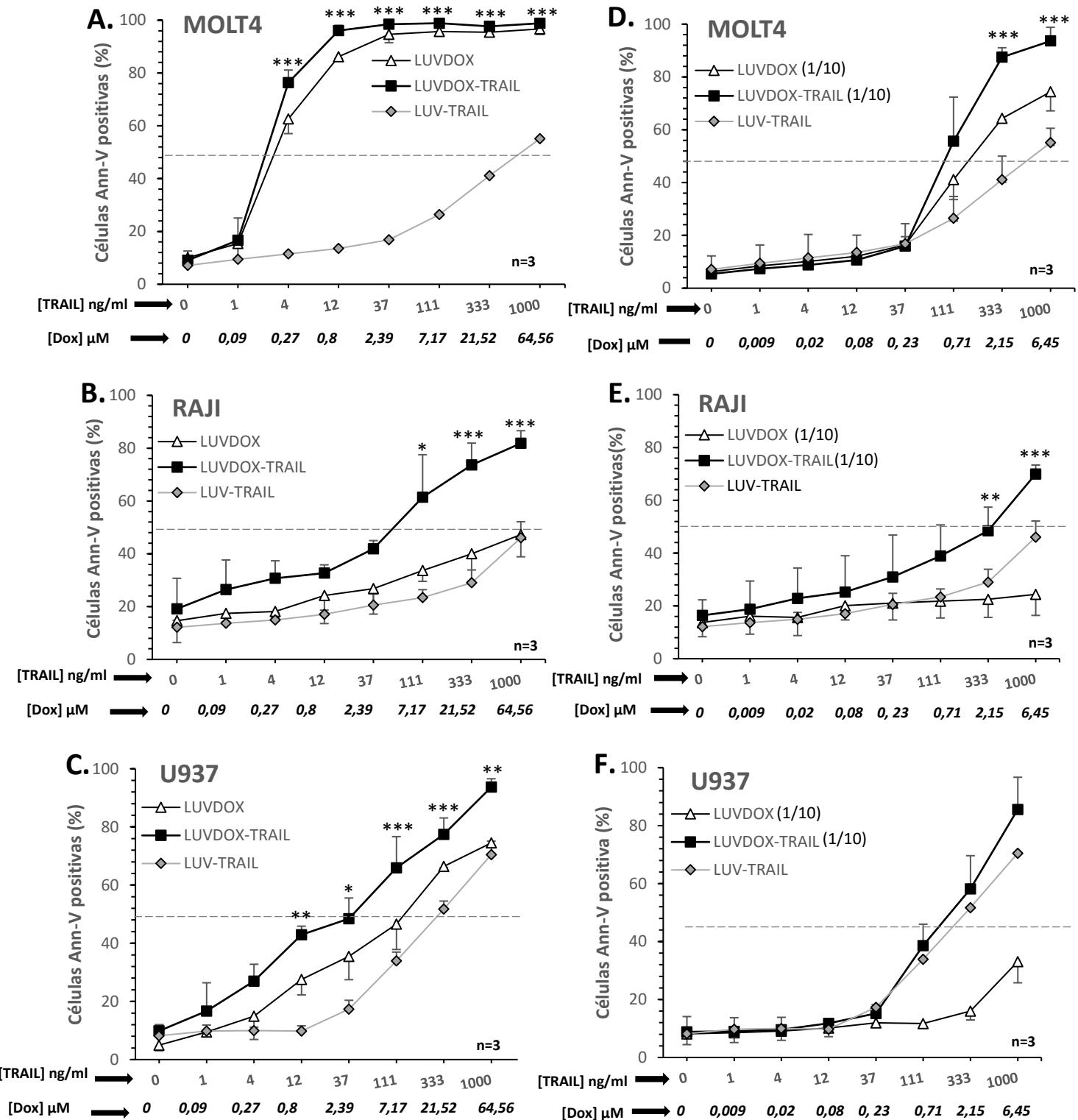


Figura 6. Estudio de la capacidad citotóxica de LUVDOX-TRAIL. Se realizaron estudios dosis-respuesta sobre las diferentes líneas celulares incubando durante 24h con liposomas con doxorubicina encapsulada (LUVDOX) o con liposomas con doxorubicina encapsulada y decorados con TRAIL (LUVDOX-TRAIL). La concentración de doxorubicina empleada fue de 64,56 µM (LUVDOX y LUVDOX-TRAIL) y de 6,45 µM (LUVDOX (1/10) y LUVDOX-TRAIL (1/10)). La capacidad citotóxica se determinó analizando el porcentaje de células anexina V positivas mediante citometría de flujo. Las gráficas representan la media con la desviación estándar de los tres experimentos realizados en: A) MOLT4. B) Raji. C) U937 con una concentración de doxorubicina de 64,56 µM y en: D) MOLT4. E) Raji. F) U937 con una concentración de doxorubicina de 6,45 µM (1/10).

En todas las gráficas los resultados de citotoxicidad de LUVDOX-TRAIL se comparan con los de LUV-TRAIL obtenidos en ensayos anteriores (Figura 3). La significación estadística se consideró con valores de * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,005$.

Figura 7.

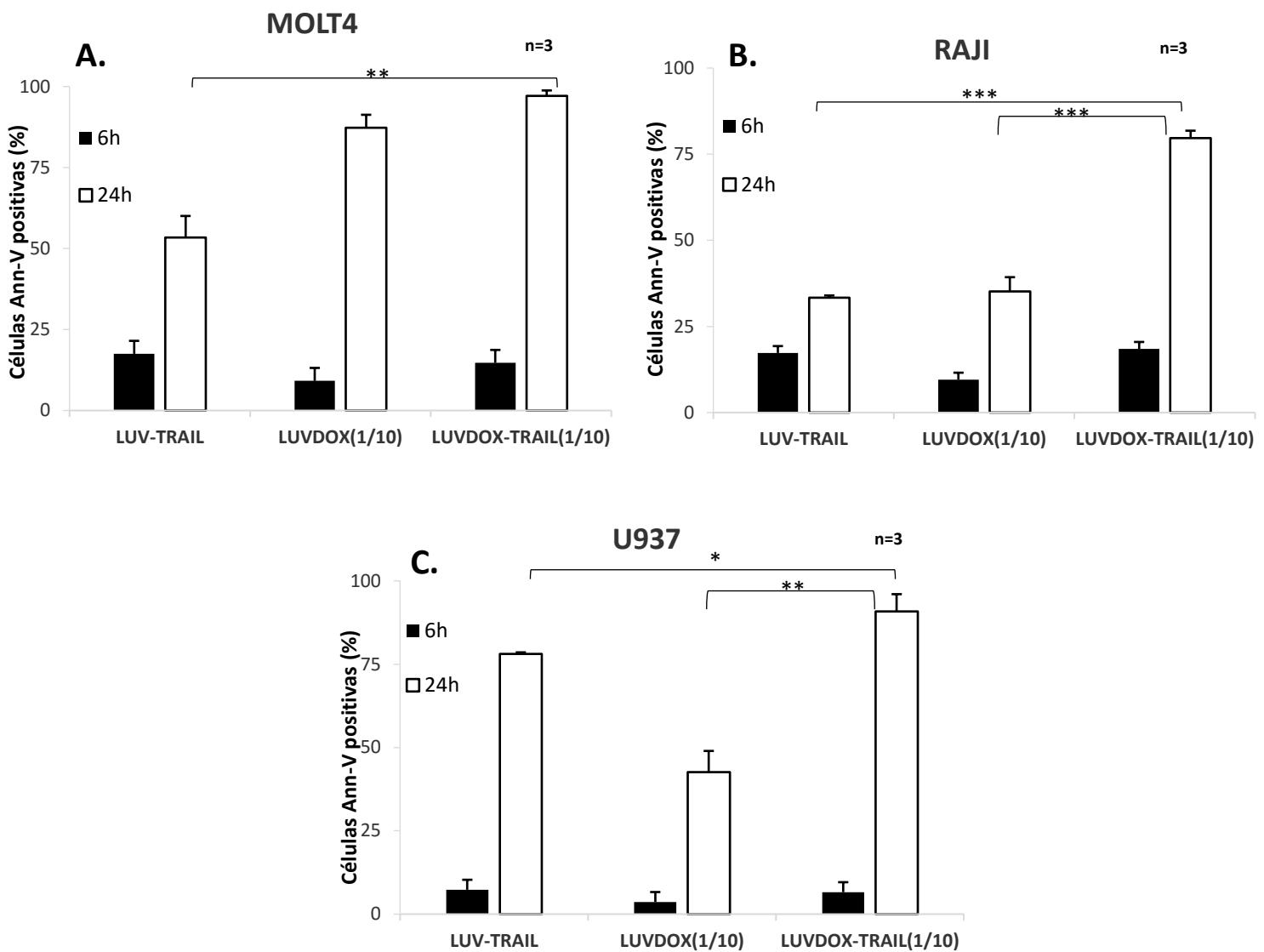


Figura 7. Estudio de las características cinéticas de muerte inducida por LUVDOX-TRAIL (1/10). Se realizaron ensayos dosis-respuesta incubando las células con LUVDOX (1/10), LUVDOX-TRAIL (1/10) a concentración de TRAIL de 1000 ng/ml, y con LUV-TRAIL a concentración de TRAIL de 1000 ng/ml. Posteriormente, se cuantificó el porcentaje de células anexina V positivas tras 6 y 24 horas de incubación. En la gráfica se representa la media de los experimentos realizados con la desviación estándar de los 3 experimentos realizados analizando los porcentajes de células anexina V positivas a los tiempos indicados en: **A) MOLT4.** **B) Raji.** **C) U937.**

La significación estadística se consideró con valores de * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,005$.

Figura 8.

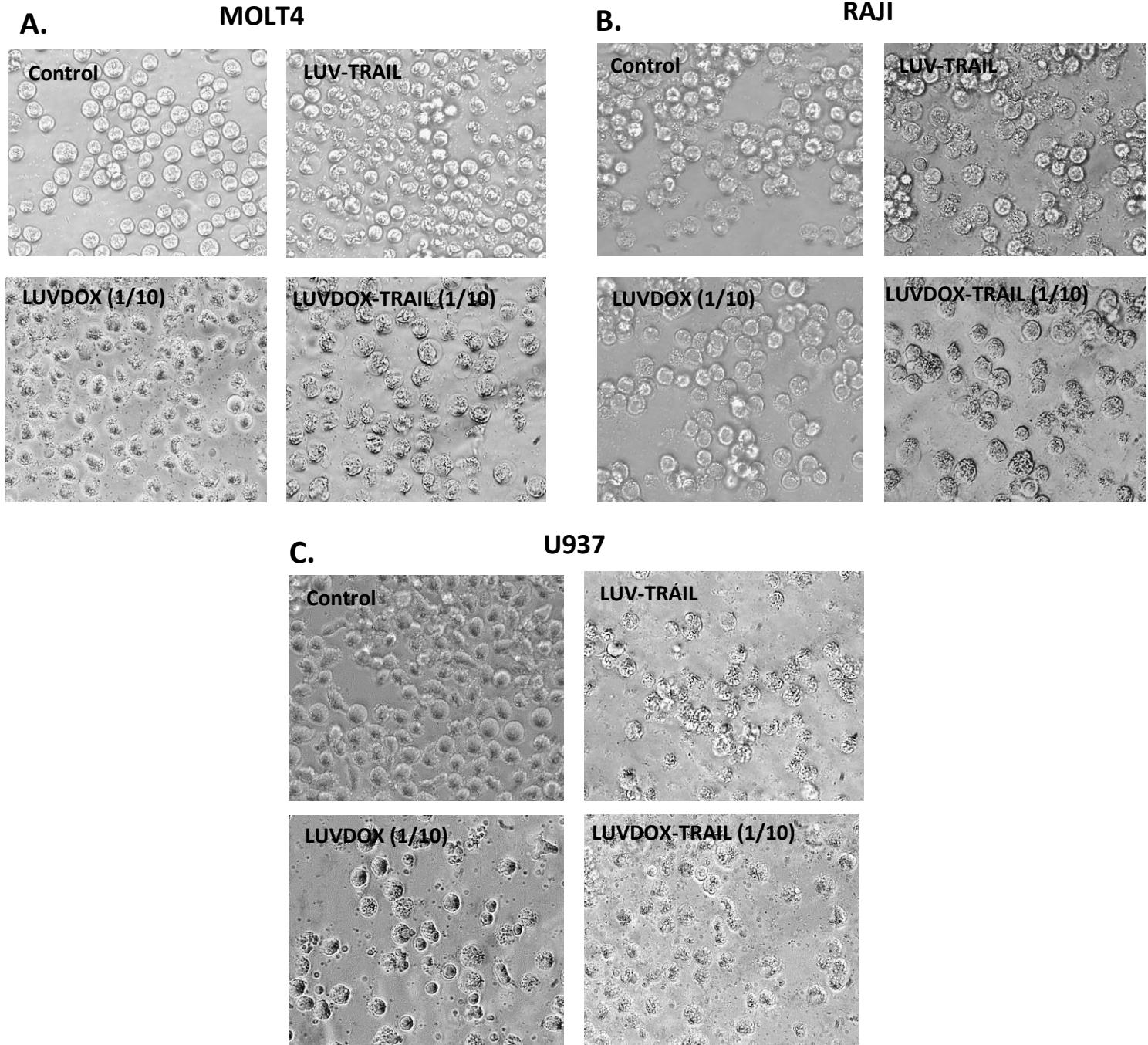
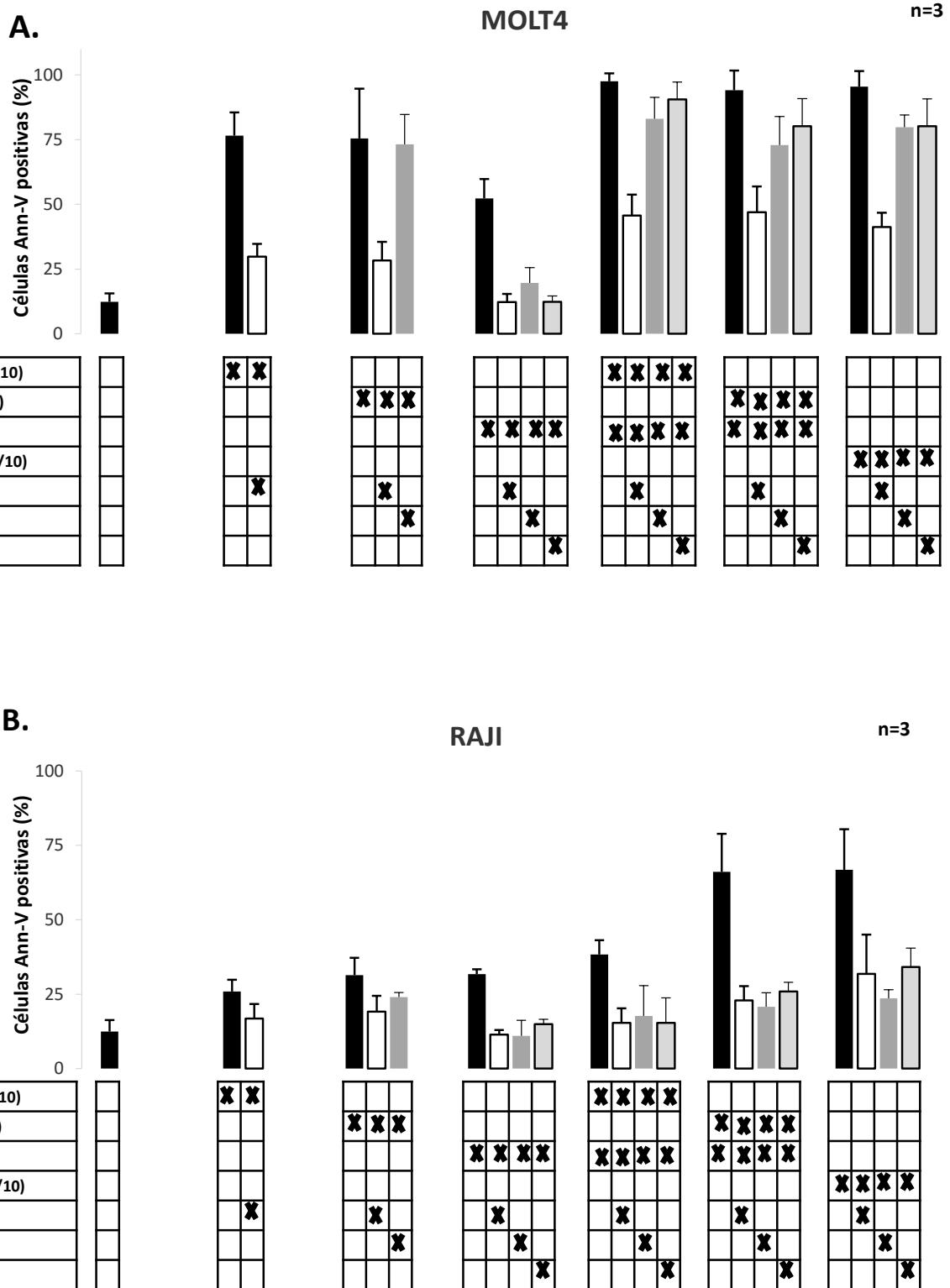


Figura 8. Análisis por microscopia de campo luminoso de LUVDOX-TRAIL. Imágenes de las células sin tratar (control) y tratadas con las distintas formulaciones (LUV-TRAIL, LUV-DOX (1/10) y LUVDOX-TRAIL (1/10)) durante 24 horas en: **A)** MOLT4. **B)** Raji. **C)** U937 . Aumento original 400x.

Figura 9.



C.**U937**

n=3

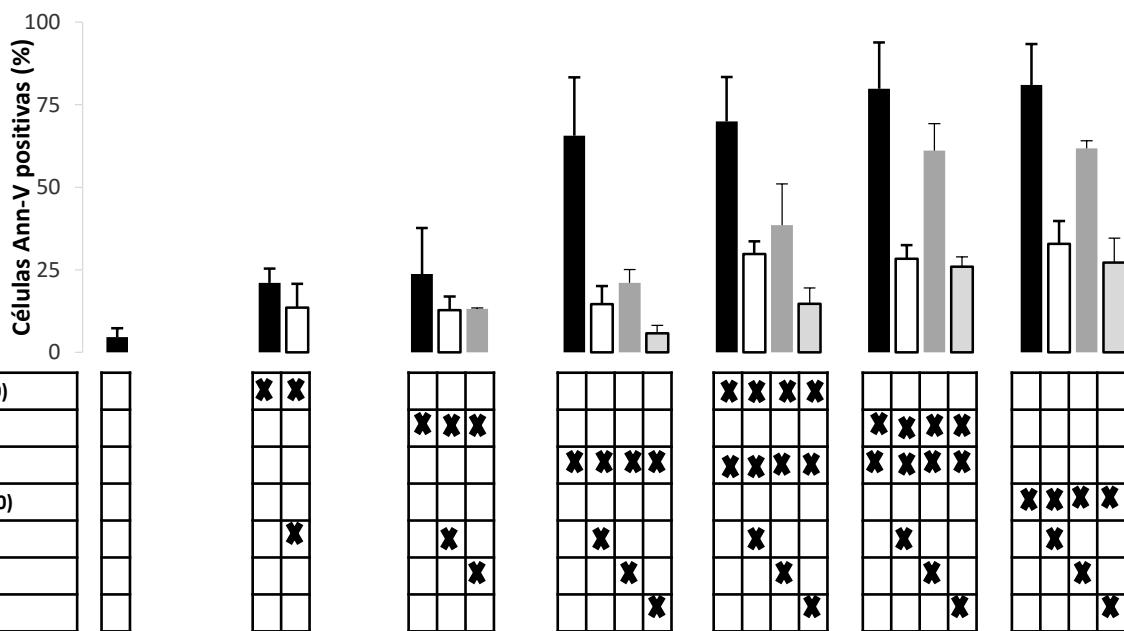
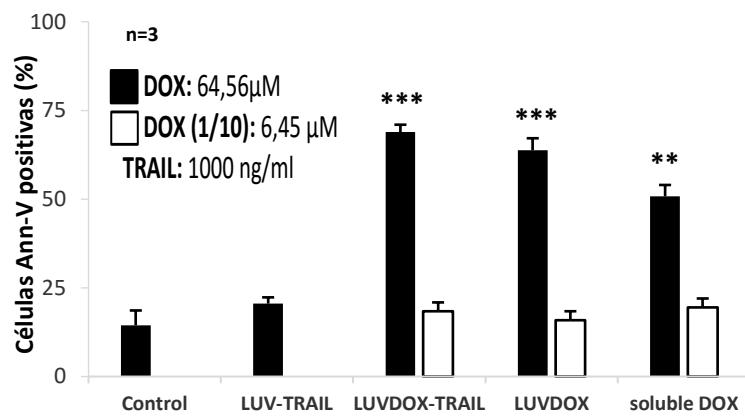


Figura.9. Caracterización de la muerte celular inducida por LUVDOX-TRAIL (1/10). Se realizaron ensayos de citotoxicidad para analizar efecto pro-apoptótico de las distintas combinaciones de fármacos en presencia y ausencia de z-VAD (inhibidor general de las caspasas, 30 μ M), z-IETD (inhibidor específico de la caspasa 8, 30 μ M) y RIK (anticuerpo bloqueante de TRAIL, 2,5 μ g/ml). Las distintas formulaciones y combinaciones de fármacos empleadas fueron: doxorubicina soluble (soluble DOX), LUVDOX (1/10), LUV-TRAIL, LUV-TRAIL + soluble DOX, LUV-TRAIL + LUVDOX y LUVDOX-TRAIL(1/10). La concentración de TRAIL en todas las formulaciones fue de 1000 ng/ml. Los compuestos z-VAD, z-IETD y RIK se adicionaron 1 hora antes de añadir los distintos tratamientos. Tras 24 horas se analizó el porcentaje de células anexina V positivas en **A) MOLT4. B) Raji. C) U937.**

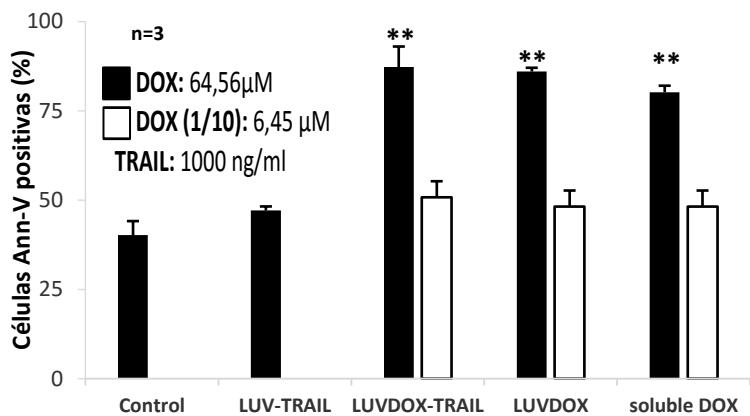
En las tres gráficas cada barra representa la media con la desviación estándar de los 3 experimentos realizados.

Figura 10.

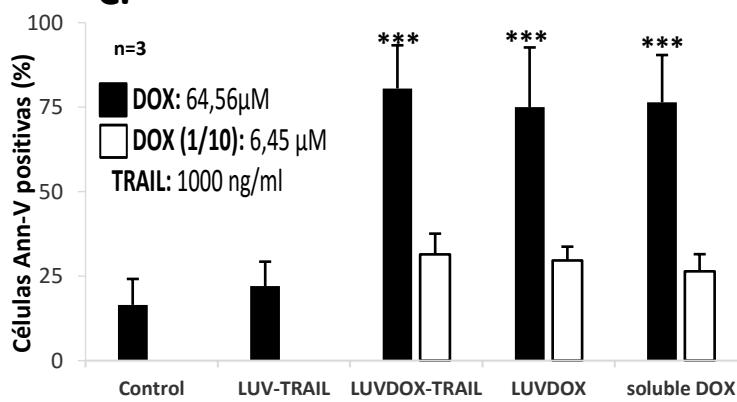
A. PBMCs (Día 0)



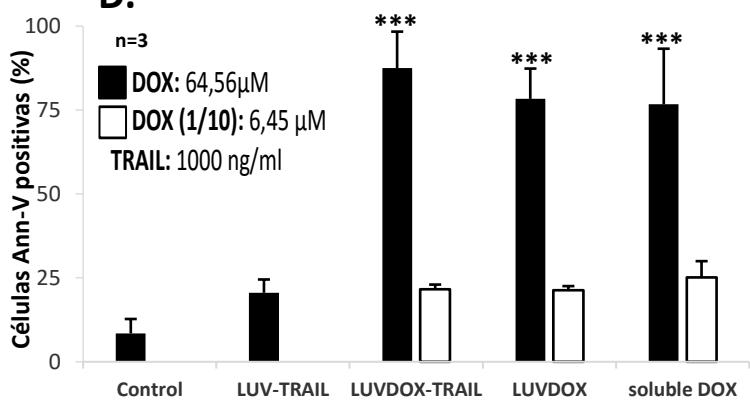
B. Células T activadas (día 6)



C. Act. T células (CD4+)



D. Act. T células (CD8+)



E. Análisis de citofluorimetría

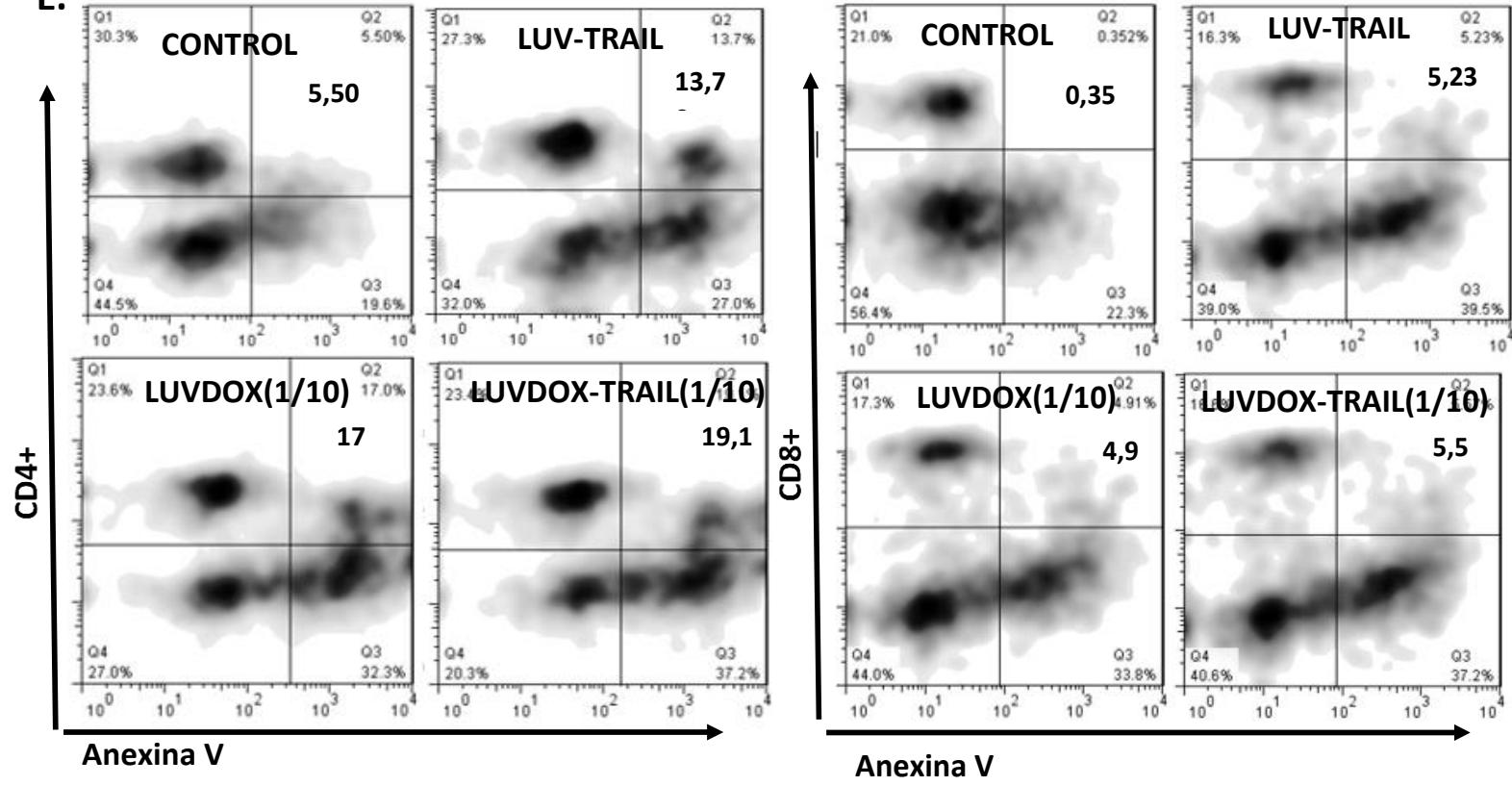


Figura.10. Efecto citotóxico de LUVDOX-TRAIL (1/10) en PBMCs y en células T activadas. Se realizaron ensayos de citotoxicidad sobre células sanguíneas normales obtenidas de donantes sanos. Las células se incubaron durante 24 horas con 1000 ng/ml de LUV-TRAIL, LUVDOX-TRAIL a concentración de TRAIL (1000 ng/ml) y variando las concentraciones de doxorubicina encapsulada (DOX: 64,56 μ M o DOX (1/10):6,45 μ M), con LUVDOX y con doxorubicina soluble (soluble DOX) variando la concentración de doxorubicina. Posteriormente la citotoxicidad fue evaluada analizando el porcentaje de células anexina V positivas mediante citometría de flujo en: **A)** PBMC recién asilados **B)** células T activadas tras 6 días de activación.

También se evaluó la citotoxicidad de los distintos compuestos en: **C)** linfocitos T activados CD4+. **D)** linfocitos T activados CD4+. Para ello, en las células T-activadas se realizó un doble marcaje con anexinaV y un anticuerpo anti-CD8-FITC o anti-CD4-FITC para cada caso. **E.)** Histogramas de densidad de citometría de un experimento representativo en el que se muestra el ensayo de citotoxicidad empleando LUV-TRAIL, LUVDOX (1/10) y LUVDOX-TRAIL (1/10) en los linfocitos T activados CD4+ y CD8+ .