

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA



Universidad
Zaragoza

**Bioquímica y Biología
Molecular y Celular**
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA



**Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular y Celular**
**Grupo GEMM: Instituto de Investigación en Ingeniería de
Aragón.(I3A)**

Proyecto Máster

Uso de plataformas microfluídicas para la valoración de drogas anti-tumorales

Presentado por:
Sandra Erviti Ardanaz

Directores:
Dr. Luis Martinez Lostao
Dr. Ignacio Ochoa Garrido

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

D. Luis Martínez Lostao, Doctor en Medicina y Cirugía y Profesor del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, y D. Ignacio Ochoa Garrido, Doctor en Biología y Profesor del Departamento de Anatomía e Histología Humanas de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN:

Que el Proyecto Máster **“Uso de plataformas microfluídicas para la valoración de drogas anti-tumorales”**, ha sido realizado por la Graduada en Biología *Sandra Erviti Ardanaz* en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza y en el Grupo de Mecánica Estructural y Modelado de Materiales del Instituto Universitario de Investigación en Ingeniería de Aragón bajo su dirección, y que reúne a su juicio, las condiciones requeridas para optar al título de Máster en Biología Molecular y Celular.

Zaragoza, Septiembre de 2015

Fdo: D. Luis Martínez Lostao

Fdo: D. Ignacio Ochoa Garrido

1. LISTADO DE ABREVIATURAS.....	6
2. ANTECEDENTES	7
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	8
4. RESUMEN Y ABSTRACT	9
5. INTRODUCCIÓN	10
5.1. APOPTOSIS.....	10
5.1.1. Caspasas.....	10
5.1.2. Mecanismos de activación.....	11
5.1.2.1. Vía intrínseca	11
5.1.2.2. Vía extrínseca.....	12
5.2. APO2L/TRAIL.....	14
5.2.1. TRAIL como agente anti-tumoral.....	16
5.3. MICROFLUÍDICA.....	18
5.3.1. Chip poliestireno: cultivo celular 3D.....	20
6. METODOLOGÍA.....	22
6.1. CULTIVOS CELULARES	22
6.1.1. Mantenimiento celular	22
6.1.2. Congelación/descongelación de líneas celulares	22
6.1.3. Cuantificación celular.....	23
6.2. GENERACIÓN LUV-TRAIL.....	23
6.2.1. Preparación de Vesículas Lipídicas	
tipo LUV (<i>LargeUnilamellar Vesicles</i>)	23
6.2.2. Incubación de LUV con TRAIL.....	25
6.3. CULTIVOS 3 DIMENSIONES	25
6.3.1. Elaboración de hidrogel de colágeno	26
6.3.2. Difusión dextrano (\approx TRAIL) y LUVTRAIL-Rho	27
6.4. ESTUDIOS CITOTOXICIDAD Y APOPTOSIS	28
6.4.1. Cultivos celulares convencionales	28
6.4.1.1. Viabilidad celular (<i>Método Mosmann</i>).....	28
6.4.1.2. Citometría de flujo	29
6.4.1.3. Hoechst.....	30
6.4.1.4. Ensayo Clonogénico	30

6.4.2. cultivos celulares en 3 dimensiones	31
6.5. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	32
6.5.1. Extracción y fraccionamiento de lisados celulares	32
6.5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS	32
6.5.3. Transferencia de proteínas a membranas	33
6.5.4. Análisis de proteínas por <i>Western Blot</i>	33
6.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	34
7. RESULTADOS	35
7.1. EFECTO DE LUVS-TRAIL SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER PULMONAR (A549).....	35
7.1.1. Efecto citotóxico de LUV-TRAIL.....	35
7.1.2. Cambios morfológicos nucleares tras el tratamiento con LUV-TRAIL.....	37
7.1.3. Activación de las caspasas tras el tratamiento con los LUV-TRAIL.....	38
7.1.4. Inhibición de la citotoxicidad inducida por LUV-TRAIL con inhibidor de caspasas z-VAD.....	39
7.2. EFECTO DE LUVS-TRAIL SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER RENAL (CAKI-1)....	40
7.2.1. Efecto citotóxico de LUV-TRAIL.....	40
7.2.2. Cambios morfológicos nucleares tras el tratamiento con LUV-TRAIL.....	42
7.2.3. Activación de las caspasas tras el tratamiento con los LUV-TRAIL....	44
7.2.4. Inhibición de la citotoxicidad inducida por los LUV-TRAIL con inhibidor de caspasas z-VAD	45
7.3. CULTIVOS 3 DIMENSIONES	45
7.3.1. Difusión dextrano (\approx TRAIL) y LUVTRAIL-Rh	45
7.3.2. Ensayo citotoxicidad sobre la línea celular A549 en 3D	47
7.3.3. Ensayo citotoxicidad sobre la línea celular Caki1 en 3D.....	49
8. DISCUSIÓN	52
9. CONCLUSIONES	57
10. BIBLIOGRAFÍA.....	58

1. Listado de abreviaturas

ABB: *Annexin Binding Buffer*

AIF: *Apoptosis-Inducing Factor*

Apo2L: *Apo2 Ligand*

BCA: *Bicinchoninic Acid*

BCL-2: *B-cell Lymphoma 2*

DcR: *Decoy Receptor*

DD: *Death Domain*

DISC: *Death-Inducing Signaling Complex*

DMEM: *Dulbecco's Minimal Essential Medium*

DR: *Death Receptor*

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic Acid*

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FADD: *Fas-Associated Death Domain*

FITC: *Fluorescein Isothiocyanate*

LUV: *Large Unilamellar Vesicles*

MLV: *Multi Lamellar Vesicles*

MTT: *3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide*

PBS: *Phosphate Buffered Saline*

PE: *Phycoerythrin*

PE-Rho: *Phosphatidylethanolamine-Rhodamine*

RANKL: *Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand*

SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate*

SMAC/ DIABLO: *Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/ Direct IAP Binding Protein with Low pI*

TEMED: *Tetramethylethylenediamine*

TNF: *Tumor Necrosis Factor*

TRAIL: *TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*

TRITC: *Tetramethylrhodamine isothiocyanate*

z-VAD: *Z-Val-Ala-Asp(OMe)-fluoromethylketone*

2. Antecedentes

Apo2L/TRAIL (*Apo 2 Ligand / TNF Related Apoptosis Inducing Ligand*) es un ligando mortal de la familia del TNF capaz de inducir apoptosis en una amplia variedad de células tumorales pero no en células normales lo que hace de esta molécula un prometedor agente anti-tumoral y de hecho, se han llevado a cabo diversos ensayos clínicos en fase I/II en los que se emplea terapia basada en TRAIL como tratamiento frente a distintos tumores fundamentalmente TRAIL soluble y anticuerpos agonistas de los receptores pro-apoptóticos de TRAIL. Sin embargo, hasta el 50% de las células tumorales presentan resistencia a la muerte inducida por TRAIL por lo que nuevas formulaciones basadas en este ligando mortal son necesarias para mejorar su capacidad citotóxica.

Nuestro grupo demostró que los ligandos mortales (FasL y TRAIL) están preformados en los linfocitos T humanos activados y son secretados como proteínas transmembrana asociados a unas microvesículas lipídicas llamadas **exosomas** siendo esta la forma fisiológica de secreción de los ligandos mortales como TRAIL. Es por ello que nuestro grupo ha desarrollado una nueva formulación de TRAIL basada en el anclaje de esta molécula a la superficie de nanopartículas lipídicas del tipo LUV (*Large Unilamellar Vesicles*) denominados **LUV-TRAIL** y cuya capacidad citotóxica *in vitro* frente a diversas líneas celulares tumorales humanas es superior a TRAIL soluble.

La mayoría de la experimentación actual en el campo de las drogas anti-tumorales se realiza con cultivos celulares en placas y/o frasco de cultivo convencionales. Esta metodología aunque útil, tiene sus limitaciones siendo habitualmente necesario llegar a los modelos de experimentación animal para validar la eficacia de las drogas en estudio. El Grupo de Mecánica Estructural y Modelado de Materiales (GEMM) ha desarrollado **plataformas microfluídicas** para el mantenimiento de cultivos celulares tridimensionales. Estas plataformas pueden resultar muy útiles ya que llevando a cabo el cultivo tridimensional de células tumorales se puede asemejar *in vitro* las condiciones *in vivo* del microambiente tumoral pudiéndose emplear para valorar el efecto de drogas anti-tumorales en un ambiente de mucha mayor relevancia fisiopatológica.

3. Hipótesis y objetivos

Hipótesis:

Dado que los LUV-TRAIL han demostrado una mayor capacidad citotóxica que TRAIL soluble frente a distintas líneas celulares tumorales provenientes de distintos cánceres humanos en cultivos celulares convencionales y puesto que los cultivos celulares tridimensionales son una plataforma experimental más realista a la hora de asemejar el microambiente tumoral obteniendo unos resultados más cercanos a los resultados *in vivo*, la hipótesis de este trabajo es validar la mayor capacidad citotóxica *in vitro* de los LUV-TRAIL en comparación con TRAIL soluble observada en los cultivos convencionales y validar el empleo de las plataformas microfluídicas para valorar el efecto de drogas anti-tumorales.

Objetivos:

- Generar nanopartículas lipídicas del tipo LUV con TRAIL acoplado a su superficie (LUV-TRAIL).
- Analizar la capacidad citotóxica tanto de los LUV-TRAIL como de TRAIL *in vitro* en diversas líneas celulares tumorales humanas provenientes de distintos tipos de cáncer.
- Generar cultivos celulares tridimensionales en plataformas microfluídicas empleando líneas celulares tumorales humanas provenientes de distintos tipos de cáncer.
- Analizar distintos parámetros farmacodinámicos y farmacocinéticos tanto de los LUV-TRAIL como de TRAIL soluble en los cultivos celulares tridimensionales generados en plataformas microfluídicas.
- Analizar la capacidad citotóxica tanto de los LUV-TRAIL como de TRAIL en los cultivos celulares tridimensionales generados en plataformas microfluídicas.

4. Resumen y Abstract

La nueva formulación de TRAIL basada en su asociación a vesículas lipídicas de tipo LUV (*Large Unilamellar Vesicles*) denominada LUV-TRAIL ha aumentado la capacidad citotóxica de TRAIL frente a distintas células tumorales. En este trabajo se ha comparado la citotoxicidad de TRAIL soluble y LUV-TRAIL en líneas celulares tumorales de pulmón (A549) y de riñón (Caki-1). La citotoxicidad ha sido estudiada tanto mediante cultivos celulares convencionales como mediante cultivos tridimensionales empleando plataformas microfluídicas. Los resultados obtenidos en ambos tipos de cultivos celulares muestran que los LUV-TRAIL presentan una mayor capacidad citotóxica que TRAIL soluble validando esta nueva formulación de este ligando mortal y demostrando que el empleo de plataformas microfluídicas puede ser muy útil en el estudio de diferentes compuestos anti-tumorales ya que permiten crear *in vitro* modelos tumorales que se asemejan a las condiciones *in vivo* sin el uso de animales de experimentación.

Abstract:

The novel formulation of TRAIL based on its association with LUV-type lipid vesicles (Large Unilamellar Vesicles) called LUV-TRAIL has increased the cytotoxic ability of TRAIL against different tumor cells. In this work, the cytotoxicity induced by soluble TRAIL soluble and LUV-TRAIL has been compared in tumor cell lines derived from lung cancer (A549) and kidney cancer (Caki-1). The cytotoxicity has been studied both in conventional cell cultures and tridimensional cultures using microfluidic platforms. The results obtained in both cell cultures types show that LUV-TRAIL show a higher cytotoxic capacity than soluble TRAIL validating this new formulation of this death ligand and demonstrating that the use of microfluidic platforms can be very useful in the study of different anti-tumor compounds since they allow to create an in vitro tumor model which resembles in vivo conditions without using experimental animals.

5. Introducción

5.1. APOPTOSIS

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada, ejecutada por un grupo especial de proteínas denominadas caspasas. Es un mecanismo fisiológico desencadenado por estímulos extra o/e intracelulares que está controlado en cada una de sus etapas y posee unas determinadas características morfológicas y bioquímicas bien caracterizadas: disminución del volumen celular, pérdida de adhesión, aparición de burbujas en la superficie y formación de cuerpos apoptóticos (rodeados de membrana), degradación de proteínas, fragmentación del ADN, pérdida del potencial mitocondrial y exposición de fosfatidil-serina. Este último evento propicia que los cuerpos apoptóticos sean fagocitados *in vivo* ya que sirve de señal para los macrófagos evitando de este modo el daño en los tejidos ^{1,2}.

La aberrante regulación de los mecanismos durante apoptosis es un importante factor en gran variedad de enfermedades. Defectos en la apoptosis pueden favorecer la aparición de cáncer y puede contribuir a diferentes enfermedades autoinmunes y desordenes metabólicos. En contra una excesiva muerte celular es un componente importante en desordenes neurodegenerativos, lesión miocárdica e infertilidad ^{3,4}.

5.1.1. Caspasas

Las caspasas son una familia de proteasas involucradas en apoptosis y activación de citoquinas pro-inflamatorias. Son cisteín proteasas específicas de ácido aspártico (Asp) con una cisteína en su sitio activo ⁵.

Existen dos tipos de caspasas: iniciadoras y efectoras. Las caspasas efectoras actúan sobre enzimas implicadas en la reparación del ADN, endonucleasas y proteínas estructurales de la lámina nuclear. Las caspasas iniciadoras se encargan de activar a las caspasas efectoras. Una caspasa iniciadora puede activar a muchas caspasas efectoras amplificando el número de caspasas efectoras activas finales ^{5,6}.

Todas las caspasas se sintetizan como zimógenos que deben ser proteolizados para poder realizar su función. Las formas no activas (zimógenos) de las caspasas iniciadoras y

efectoras difieren. Las iniciadoras son monoméricas, mientras que las efectoras son dimericas. Sin embargo todas ellas, iniciadoras o efectoras, en su forma activa constituyen dímeros. Los zimógenos poseen tres dominios diferenciados y separados por motivos de Asp: pro-dominio N-terminal, subunidad pequeña (p10) y subunidad grande (p20). Las caspasas iniciadoras son caracterizadas con un gran prodominio N-terminal (≥ 90 aminoácidos) mientras que las caspasas efectoras solo poseen entre 20-30 aminoácidos en este mismo dominio.

La activación de las caspasas efectoras se produce por la rotura específica en residuos de Asp que se localizan entre la subunidad grande y la pequeña. Esta proteólisis es llevada a cabo por las caspasas iniciadoras. Las caspasas iniciadoras son auto-activadas y requieren la formación de una plataforma oligomérica, que recluta y activa a la proteasas por proximidad inducida.

Por lo tanto los zimógenos iniciadores son monoméricos y su dimerización desencadena la activación, que se ve reforzada por el procesamiento proteolítico y oligomerización. Sin embargo los zimógenos efectoras son dimericos y su escisión por parte de las caspasas iniciadoras desencadena su activación^{6,7}.

5.1.2. Mecanismos de activación de la apoptosis

Los mecanismos de activación de la apoptosis constan de 2 vías, la vía intrínseca y vía extrínseca. La vía intrínseca es activada por eventos intracelulares como daño en el DNA, sobre-expresión de oncogenes o estrés metabólico y depende de factores provenientes de la mitocondria. Por otra parte la vía extrínseca depende de los receptores mortales que transmiten la señal extracelular proveniente de ligandos mortales. Estas 2 vías no son independientes sino que actúan directa o indirectamente reforzándose la una con la otra^{1,8}.

5.1.2.1. Vía intrínseca:

La vía intrínseca de la apoptosis está regulada por las proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2. Esta familia se divide en 3 subfamilias dependiendo de la similitud entre diferentes dominios denominados dominios de homología BH (BH1, BH2, BH3, BH4):

- Proteínas pro-apoptóticas solo BH3: Son proteínas que colaboran en la activación de la apoptosis y solo presentan el dominio BH3. En esta subfamilia encontramos a Bim y Bad activadas por la privación de citoquinas y Puma y Noxa por daño en el DNA.
- Proteínas pro-apoptóticas multi-dominio: Proteínas que activan la apoptosis y comparten dominios BH1, BH2 y BH3. Entre ellas, las principales son Bax y Bak que al recibir un determinado estímulo se asocian y crean canales en la membrana mitocondrial.
- Proteínas anti-apoptóticas multi-dominio: presentan los 4 dominios excepto Mcl-1 que carece de BH4. Bcl-2, Bcl-xL inhiben y neutralizan a las proteínas pro-apoptóticas.

Al producirse daño celular se activan diferentes factores que activan a las proteínas pro-apoptóticas de la familia BH2 entre ellas Bax y Bak que forman poros en la membrana mitocondrial permitiendo la salida de del citocromo c, AIF y Smac/Diablo al citosol. El citocromo c se une y activa a la proteína adaptadora (Apaf-1) formándose el apoptosoma, que media la activación auto-catalítica de la caspasa 9, y esta a su vez activa a la principal caspasa efectora, caspasa 3^{1,3}.

5.1.2.2. Vía extrínseca

La vía extrínseca es mediada por la activación de receptores de la familia del TNF. Reciben señales extracelulares por parte de ligandos de muerte (FasL, Apo2L/TRAIL) que se unen a sus receptores específicos en las superficies celulares⁹. Los receptores de muerte son proteínas transmembrana de tipo I caracterizados por la presencia de 2-4 dominios ricos en cisteína en el dominio extracelular, además presentan un dominio intracelular en el C-terminal del receptor denominado dominio de muerte (*death domain*, DD).

Los ligandos de muerte son proteínas homo-triméricas cuya unión a sus receptores conduce a la formación de un complejo ligando receptor que recluta factores citosólicos, tales como FADD y caspasa 8, formando el complejo DISC. La formación de DISC conduce a la activación de las caspasas iniciadoras (caspasa 8 y caspasa 10), la

cuales posteriormente activarán a las caspasas efectoras, fundamentalmente caspasa 3^{10,11}.

Ambas vías de la apoptosis están interconectadas a través de la degradación mediada por caspasa 8 de la proteína pro-apoptótica Bid, la cual provoca la activación de la vía mitocondrial¹².

Figura 1.

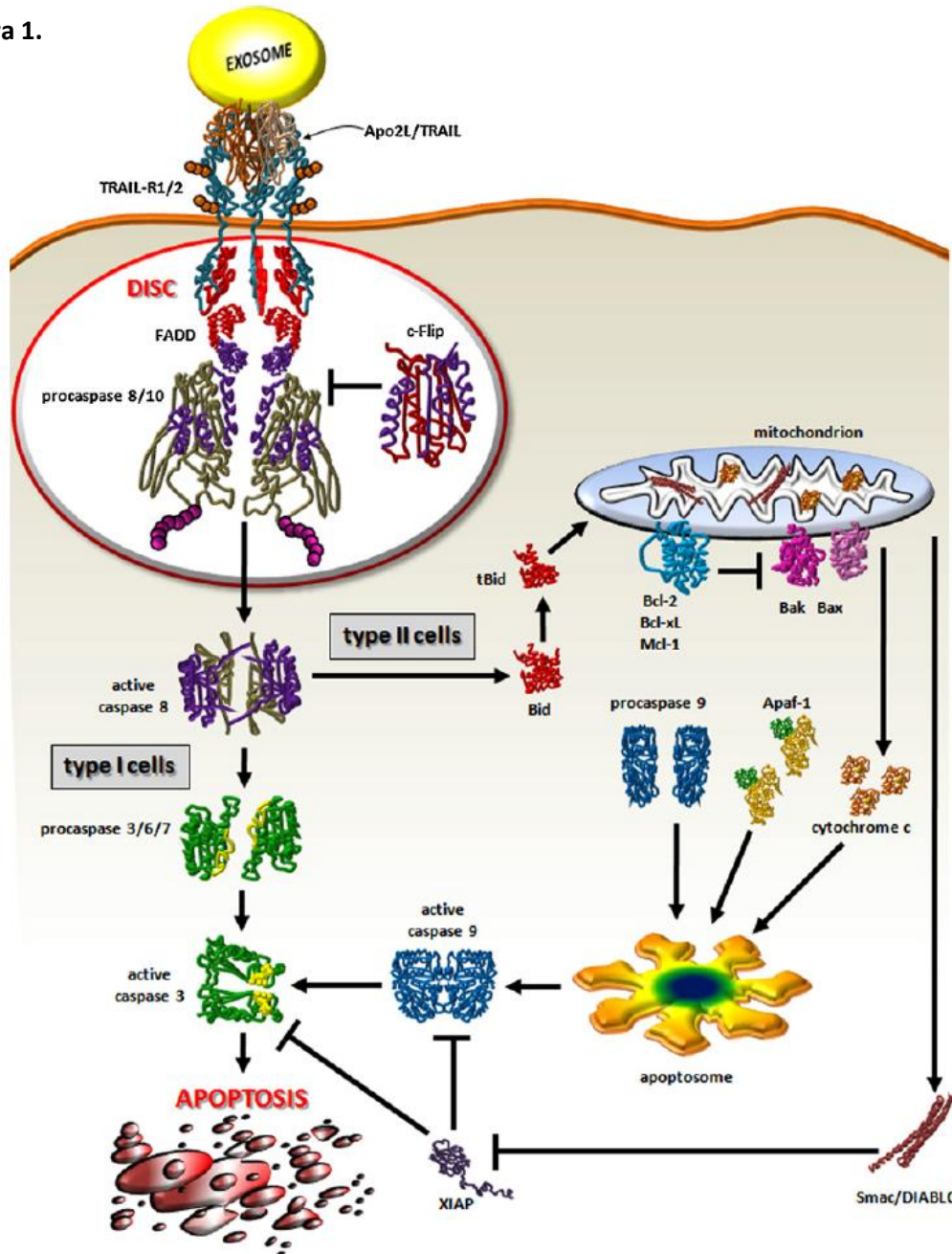


Figura 1: Mecanismo molecular de la apoptosis (Martinez-Lostao L. et al. Biochem. Pharmacol. 83(11):1475-83. 2012).

5.2. APO2L/TRAIL

El ligando mortal Apo2L/TRAIL (a partir de ahora TRAIL) es un miembro de la super-familia del factor de necrosis tumoral (TNF) que induce apoptosis en una gran variedad de células tumorales sin afectar a las células normales. Por consiguiente está siendo estudiado como candidato anti-tumoral ^{13,14}.

El gen de 20 kb que codifica a TRAIL se localiza en el cromosoma 3, y está compuesto por 5 exones y 4 intrones. Como miembro de la super-familia del TNF, se expresa como una proteína transmembrana de tipo II, que posee 281 aminoácidos con un peso molecular de 20 kDa. No se conserva el dominio citoplásmico (N-terminal) a lo largo de los miembros de la familia TNF pero el dominio extracelular (C-terminal) es conservado y se puede escindir mediante proteólisis ¹⁵.

Como la mayoría de los miembros de la familia TNF, TRAIL forma homo-trímeros para ejercer su función. Esta trimerización potencia la actividad citotóxica de TRAIL en comparación con la forma monomérica. Cada monómero (20 kDa) está formado por cadenas betas anti-paralelas distribuidas en dos laminas beta. Un átomo de Zinc es esencial para la estabilidad del trímero y una actividad biológica óptima ^{16,17}.

Figura 2.

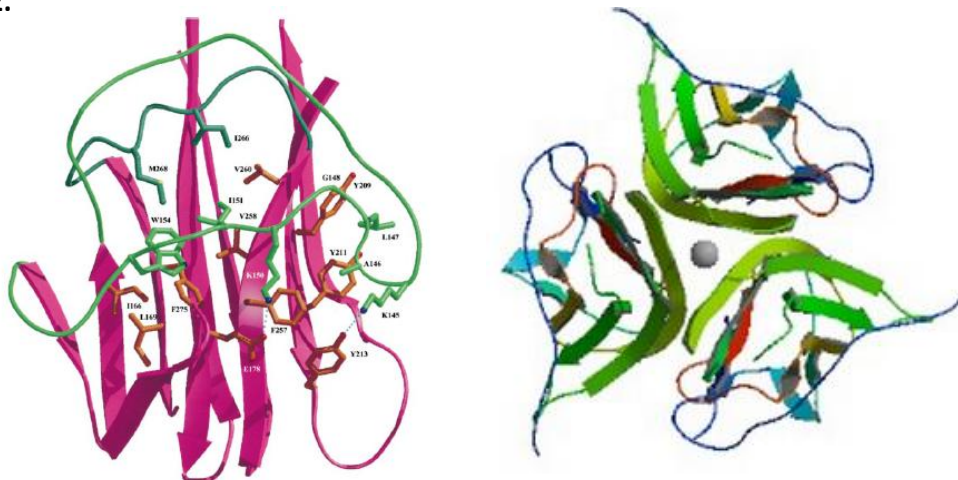


Figura 2: Monómero y trímero de TRAIL (Cha SS. et al. *Immunity*. 11(2):253-61. 1999. Hymowitz SG. et al *Biochemistry*. 39(4):633-40. 2000).

Existe una inserción única en TRAIL de 12-16 aminoácidos en forma de bucle capaz de introducirse en el sitio de unión con el receptor. El bucle altera drásticamente la

superficie de unión al receptor común de la familia TNF y por ello TRAIL posee diversos receptores específicos ¹⁶.

TRAIL puede interaccionar con 5 receptores diferentes: 2 receptores mortales denominados DR4 (TRAIL-R1) y DR5 (TRAIL-R2), 2 receptores señuelo DcR1 (TRAIL-R3) y DcR2 (TRAIL-R4) y el receptor soluble de baja afinidad denominado osteoprogesterina (OPG) ^{9,18}.

Únicamente DR4 y DR5 son capaces de originar la formación del DISC por medio de dominios de muerte (DD) localizados en su zona intracelular. Aunque los dominios extracelulares de estos receptores son altamente similares DcR1 es un receptor glicosil-fosfatidil-inositol que carece de dominio intracelular y DcR2 solamente contiene un dominio intracelular truncado con DD no funcionales. En consecuencia, estos 2 receptores son incapaces de inducir apoptosis. Sin embargo, tanto DcR1 como DcR2 poseen afinidad por TRAIL, pudiendo tener una función de unión competitiva con los receptores pro-apoptóticos ^{3,19}.

Por último, OPG está involucrado principalmente en la regulación de la actividad de los osteoclastos por la inhibición de RANKL, y en algunos casos puede inhibir parcialmente la apoptosis inducida por TRAIL aunque con baja afinidad ¹⁹.

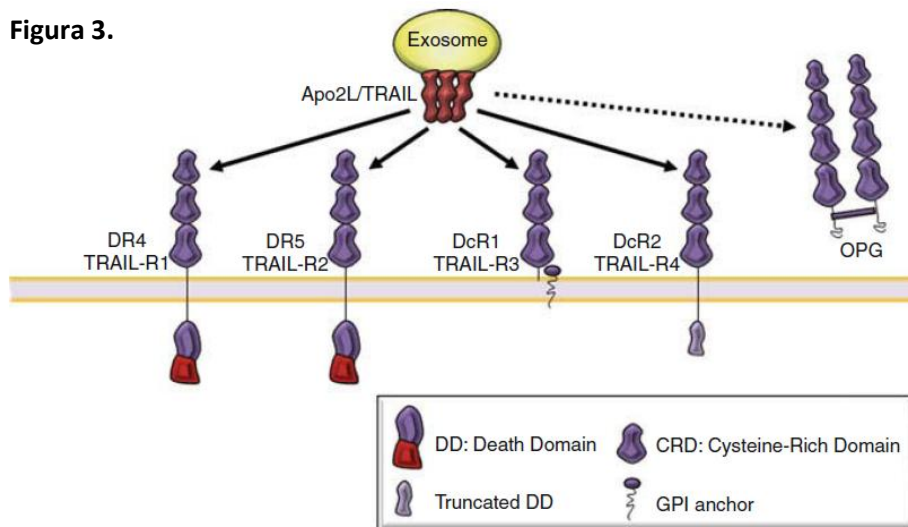


Figura 3: Receptores de TRAIL (Martinez-Lostao L. et al. Apo2L/TRAIL. Encyclopedia of Signaling Molecules. 2012).

5.2.1. TRAIL como agente anti-tumoral.

Tabla 1: Resultados dulanermin (TRAIL soluble recombinante) en ensayos clínicos

Dulanermin (AMG-951/rhApo2L)						
Phase	n	Cancer	Combination	Safety	Efficacy	Reference
I	71	Advanced cancers	—	Safe	2 Responses (2PR)	135
I	23	Colorectal	Chemo + BV	Safe	13 Responses (13PR)	140
I	27	Colorectal	Chemo + BV	Safe	6 Responses (6PR)	141
I	30	Colorectal	Chemo + CX	Safe	NA	142
I	24	Lung	Chemo + BV	Safe	14 Responses (1CR/13PR)	143
I	7	Lymphoma	Rituximab	Safe	3 Responses (2CR/1PR)	144
II (RCT)	213	Lung	Chemo + BV	Safe	No anticancer activity ^a	106
II (RCT)	48	Lymphoma	Rituximab	Safe	No anticancer activity ^a	107

Abbreviations: BV, bevacizumab; chemo, chemotherapy; CR, complete response; CX, cetuximab; PR, partial response; n, number of patients enrolled; NA, data about responses (efficacy) were not reported; RCT, randomized-controlled trials

^aAnticancer activity was considered when the addition of the TRA demonstrated statistically significant activity compared with the standard therapy

Tabla 2: Resultados de mapatumumab, un anticuerpo agonista de DR4 en ensayos clínicos

Mapatumumab (HGS-ETR1)						
Phase	n	Cancer	Combination	Safety	Efficacy	Reference
I	49	Advanced cancers	—	Safe	No responses	145
I	41	Advanced cancers	—	Safe	No responses	146
I	49	Advanced cancers	Chemo	Safe	12 Responses (12PR)	147
I	27	Advanced cancers	Chemo	Safe	5 Responses (5PR)	148
I/II	40	Lymphoma	—	Safe	3 Responses (2CR/1PR)	149
II	38	Colorectal	—	Safe	No responses	150
II	32	Lung	—	Safe	No responses	151
II (RCT)	104	Multiple myeloma	Bortezomib	Safe	No anticancer activity ^a	121
II (RCT)	109	Lung	Chemo	Safe	No anticancer activity ^a	152

Abbreviations: chemo, chemotherapy; CR, complete response; n, number of patients enrolled; PR, partial response; RCT, randomized-controlled trial

^aAnticancer activity was considered when the addition of the TRA demonstrated statistically significant activity compared with the standard therapy

Tablas 1, 2 Y 3 (Lemke J. et al. Cell Death Differ. 21(9):1350-64. 2014).

Desde su primera descripción TRAIL fue considerado un prometedor agente anti-tumoral ya que este ligando mortal era capaz de inducir la muerte celular en un amplio abanico de células tumorales sin afectar a las células normales.²⁰ De hecho, se han llevado a cabo numerosos ensayos pre-clínicos y varios ensayos clínicos centrados en el uso de TRAIL como agente terapéutico frente a distintos tipos de cáncer¹⁹. Son fundamentalmente 2 las estrategias terapéuticas basadas en empleo de TRAIL como tratamiento de diversos tipos de cáncer; el empleo de la forma recombinante soluble de TRAIL y el empleo de anticuerpos agonistas que reconocen los receptores pro-apoptóticos (DR4 y DR5) de TRAIL (TABLAS 1, 2 y 3)^{21,22}.

Se ha visto que un gran número de tumores humanos (alrededor de un 50%) son resistentes a la acción citotóxica de TRAIL. Sin embargo el interés de TRAIL como agente terapéutico no ha disminuido, y se siguen estudiando estrategias para vencer

esa resistencia. Entre estas estrategias se encuentran la combinación de TRAIL con distintas sustancias que sensibilizan a las células tumorales a la apoptosis inducida por TRAIL²³ o el desarrollo de nuevas formulaciones de TRAIL que presenten una mayor bioactividad frente a las células cancerosas²⁴.

Tabla 3: Resultados de anticuerpos agonistas de DR5 en ensayos clínicos

Phase	n	Cancer	Combination	Safety	Efficacy	Reference
<i>Conatumumab (AMG-655)</i>						
I	37	Advanced cancers	—	Safe	1 Response (1PR)	153
I	18	Advanced cancer	—	Safe	No responses	154
I	6	Soft tissue sarcoma	Chemo	Safe	No responses	155
I	9	Advanced cancers	Ganitumab	Safe	No responses	156
I	12	Lung	Chemo	Safe	4 Responses (1CR/3PR)	157
I	12	Colorectal	Chemo	Safe	5 Responses (5PR)	158
I	13	Pancreatic	Chemo	Safe	4 Responses (4PR)	159
II (RCT)	128	Soft tissue sarcoma	Chemo	Safe	No anticancer activity ^a	155
II (RCT)	172	Lung	Chemo	Safe	No anticancer activity ^a	160
II (RCT)	83	Pancreatic	Chemo	Safe	No anticancer activity ^a	161
II (RCT)	103	Colorectal	Chemo	Safe	No anticancer activity ^a	162
II (RCT)	190	Colorectal	Chemo + BV	Safe	No anticancer activity ^a	163
<i>Lexatumumab (HGS-ETR2)</i>						
I	37	Advanced cancers	—	Safe	No responses	164
I	31	Advanced cancers	—	Safe	No responses	165
I	41	Advanced Cancers	Chemo	Safe	Partial responses	166
I	24	Pediatric cancers	—	Safe	No responses	167
<i>Tigatuzumab (CS-1008)</i>						
I	17	Carcinoma or lymphoma	—	Safe	No responses	168
II	61	Pancreatic	Chemo	Safe	8 Responses (8PR)	169
II (RCT)	97	Lung	Chemo	Safe	No anticancer activity ^a	170
<i>Drozitumab (PRO95780/apomab)</i>						
I	9	Colorectal	Chemo	Safe	2 Responses (2PR)	171
I	50	Advanced cancers	—	Safe	No responses	172
<i>LBY-135</i>						
I/II	73	Advanced cancers	Chemo	Safe	2 Responses (2PR)	173

Abbreviations: BV, bevacizumab; chemo, chemotherapy; CR, complete response; n, number of patients enrolled; PR, partial response; RCT, randomized-controlled trial

^aAnticancer activity was considered when the addition of the TRA demonstrated statistically significant activity compared with standard therapy

Respecto a esto último, en la Universidad de Zaragoza se ha llevado generado una nueva formulación de TRAIL basada en el anclaje de este ligando mortal a la superficie de liposomas (Patente: "Liposomas recubiertos con el dominio extracelular de la proteína Apo2L/TRAIL" (Ref. WO2011020933) que presenta una capacidad citotóxica mayor que la forma soluble de TRAIL y que puede superar la resistencia a TRAIL por parte de determinadas células tumorales^{11,25,26}.

En estudios anteriores se había demostrado que TRAIL permanece almacenado dentro de cuerpos multivesiculares citoplasmáticos de células T activadas y es liberado al medio extracelular como una proteína transmembrana en la superficie de unas vesículas lipídicas conocidas como exosomas^{27,28}. Con esta información se generaron vesículas de lípidos artificiales que poseen un tamaño y una composición lipídica

similar a los exosomas naturales a las que se ha anclado la forma recombinante soluble de TRAIL en su superficie.

Esta nueva creación de liposomas con TRAIL bioactivo adherido en su superficie (LUV-TRAIL) ha mejorado en gran medida la actividad TRAIL en comparación con la forma soluble en las neoplasias hematológicas incluidas líneas celulares tumorales resistentes a la forma soluble de TRAIL^{11,25}. Se ha demostrado que la señalización de TRAIL depende casi en exclusiva de DR5 y que el mayor efecto pro-apoptótico de LUV-TRAIL se basa en su mayor capacidad para inducir el agrupamiento de DR5 y por lo tanto mejorar el reclutamiento del DISC y desencadenar la activación de caspasas de una forma más eficiente²⁵.

5.3. TÉCNICAS MICROFLUÍDICAS

La biomicrofluídica es la disciplina que integra el estudio de sistemas biológicos en soportes microfluídicos, que por definición son aquellos cuyos volúmenes de trabajo se encuentran en la escala del microlitro. Estos sistemas son una herramienta muy útil para el diagnóstico y la investigación biomédica y que poco a poco van reemplazando a los experimentos tradicionales que emplean placas de *Petri*. Los sistemas microfluídicos permiten generar complejos sistemas tridimensionales que recrean la organización tisular, incluyendo la presencia de estructuras similares a vasos sanguíneos y co-cultivos organizados^{29,30}.

El cultivo celular es un procedimiento fundamental en la biología celular, la ingeniería de tejidos, ingeniería biomédica, y la farmacocinética. Aunque la técnica de cultivo celular *in vitro* se utiliza ampliamente en experimentos de laboratorio convencionales, estos métodos proporcionan un entorno estático totalmente diferente de los entornos de los sistemas biológicos. Los tejidos son estructuras tridimensionales complejas en las que el comportamiento celular se guía con frecuencia por señales quimiotácticas y la recreación de estas condiciones *in vitro* sigue siendo difícil.

Los fenómenos que dominan a los fluidos en escala macrométrica son sensiblemente diferentes de los que dominan en la escala micrométrica. En estos sistemas, la tensión superficial y la fuerza capilar dominan sobre la fuerza de la gravedad ³¹.

Vamos a tratar una serie de conceptos de microfluídica importantes para entender estas técnicas:

El número de Reynolds (Re) es un parámetro que caracteriza el movimiento de un fluido. Relaciona la densidad, viscosidad, velocidad y la longitud del sistema en el cual se encuentre el fluido. Re es proporcional a la velocidad y la escala de longitud del sistema e inversamente proporcional a la viscosidad del fluido. Los fluidos que poseen $Re \leq 2,000$ tienen perfiles de flujo laminar, que es lo que ocurre dentro de los dispositivos microfluídicos. Esta propiedad es muy importante, ya que a diferencia del régimen turbulento, podemos predecir el comportamiento del fluido.

Tensión superficial. Es la fuerza en la superficie de un líquido que hace que el área de esa superficie sea la mínima posible. También se define como la tendencia de un fluido de reducir su energía libre en la inter-fase superficie-aire. Esta fuerza tiene un papel muy dominante en estos microsistemas y es útil a la hora de conducir fluidos pasivamente a través de microcanales.

Fuerza capilar. Describe el movimiento de un fluido a través de una constricción estrecha. Ocurre cuando la fuerza intermolecular o cohesión intermolecular es menor que la adhesión del líquido con el material del tubo. En estos microsistemas, la acción capilar es la fuerza más dominante, permitiendo que los fluidos avancen en contra de la gravedad.

Figura 4.

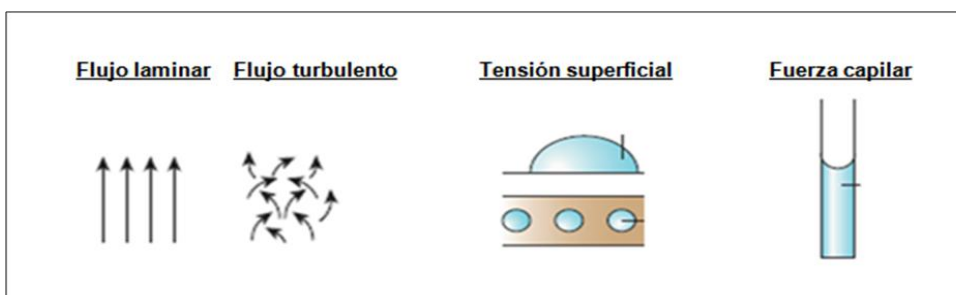


Figura 4: Conceptos microfluídica (Sackman EK. et al. Nature. 507(7491):181-9. 2014).

5.3.1. Chips poliestireno: cultivo celular tridimensional

Las técnicas de microfluídica han surgido como poderosas herramientas para imitar las condiciones fisiológicas de las células y sus tejidos. Dichas plataformas proporcionan un control mucho mayor en el microentorno celular al tiempo que se reduce enormemente el tamaño de reactivos y muestra necesarios³².

Los chips se han fabricado empleando poliestireno como material estructural. Poseen una serie de entradas y salidas compatibles con la micropipetas convencionales. Se han dotado de una serie de microcanales y microcámaras en las que introducir los diferentes reactivos y soluciones. Las microcámaras se hayan delimitadas por una serie de columnas en forma de paralelogramo que permiten confinar líquidos debido a la tensión superficial al mismo tiempo que permanecen conectadas. La microcámara central posee una anchura y extensión de 2 y 4 mm respectivamente, su altura es de 250 μm .

Figura 5.

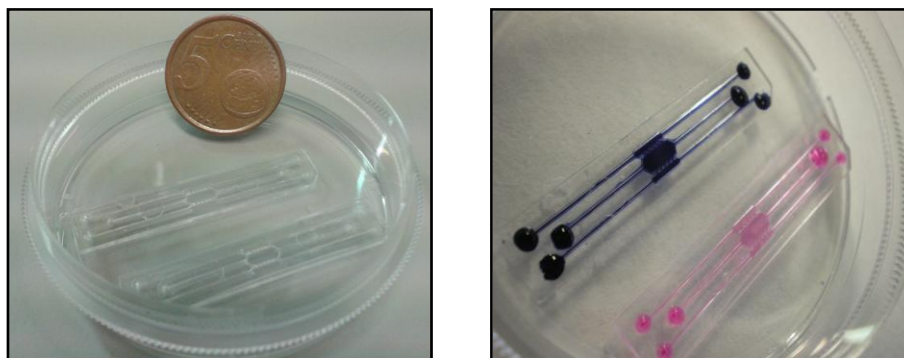


Figura 5: Imágenes reales de los microchip empleados en el presente trabajo.

Dependiendo del protocolo experimental las células podrían ser incorporadas dentro del hidrogel en la microcámara central o localizadas en los microcanales laterales.

La mayoría de los dispositivos diseñados recientemente se fabrican usando polidimetilsiloxano (PDMS), que posee unas excelentes propiedades ópticas. Sin embargo, el uso de PDMS tiene algunas desventajas, incluyendo sus pobres

propiedades mecánicas. Por ello se ha elegido como material el poliestireno, de uso común en laboratorios, tiene unas propiedades ópticas excelentes y buena resistencia mecánica.

6. Materiales y Métodos

6.1. CULTIVOS CELULARES

Para llevar a cabo este trabajo fin de máster fue necesaria la utilización de líneas celulares tumorales humanas provenientes de células epiteliales de pulmón (A549) y de riñón (Caki-1).

Como medio de cultivo se utilizó DMEM (*Gibco*) suplementado al 10% con suero fetal bovino, antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml), y glutamax. Todas las líneas celulares se cultivaron en un incubador termostaticado (*Heraeus Cell*) a 37°C y con 5% de CO₂. Todas las manipulaciones con las células se realizaron en condiciones estériles en campana de flujo laminar vertical (*Telstar*).

6.1.1. Mantenimiento celular

Para la mayoría de líneas celulares que crecen adheridas a un substrato, como son las líneas A549 y Caki-1 la forma más conveniente de conseguir una suspensión celular, es mediante la tripsinización. Primero se retiró el medio de cultivo, se lavó una vez con PBS y se procedió a su incubación con tripsina (*Gibco*; 0,05% de EDTA) durante 5 minutos, a 37°C. Una vez que las células estaban en suspensión se diluyó la tripsina añadiendo medio completo. Una vez tripsinizadas pudimos realizar distintos pases celulares para disminuir su concentración o sembrarlas en las distintas placas para realizar los experimentos correspondientes.

6.1.2. Congelación y descongelación de líneas celulares

Las células se congelaron para ser almacenadas durante un largo periodo de tiempo. Una vez tripsinizadas, fueron recogidas y centrifugadas a 1.500 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante antes de resuspenderlas en 900 µl de suero con un 10% de dimetilsulfoxido (DMSO). Tras estos pasos las células se trasladaron a un criotubo estéril (*Nunc*) que fue almacenado en un congelador a -80°C hasta su utilización.

El criotubo empleado en el procedimiento para la descongelación de las células, se dejó atemperar y se le añadió 1 ml de medio completo, se resuspendió lentamente y

se recogieron las células trasvasándolas a un tubo *Falcon* al que anteriormente se había añadido 5 ml de medio. Esta operación fue repetida 3 veces y finalmente se centrifugó 5 minutos a 1.200 rpm. El sobrenadante fue eliminado y el pellet se resuspendió en 5 ml de medio completo. Una vez realizado este proceso se incorporó a un frasco de cultivo.

6.1.3. Cuantificación celular

Para conocer la concentración de células que existían en los frascos de cultivo se realizó un recuento mediante el uso de azul tripán (*Sigma*), un colorante capaz de penetrar en células muertas que tienen la membrana plasmática dañada tiñéndolas de color azul. Las células vivas y las apoptóticas no se tiñen.

Para realizar el conteo se mezcló 50 µl de suspensión celular y 50 µl de solución de azul tripán. La mezcla se colocó sobre una cámara *Neubauer* y se procedió al conteo en un microscopio óptico (*Optiphot, Nikon*).

La densidad celular se determinó a través de la siguiente fórmula:

$$DC \text{ (cél/ml)} = \frac{n^{\circ} \text{ células viables} * \text{Factor dilución} * 10^4}{n^{\circ} \text{ cuadrantes contados}}$$

DC: Densidad celular

10⁴: Ajuste al tamaño de la cámara.

6.2. GENERACION DE LOS LUV-TRAIL

6.2.1. Preparación de Vesículas Lipídicas tipo LUV (*Large Unilamellar Vesicles*)

Para la creación de vesículas lipídicas tipo LUV (*Large Unilamellar Vesicles*) se realizó una preparación con los siguientes lípidos (*Avanti Polar Lipids*):

- Fosfatidil-Colina (de huevo)
- Esfingomielina (de cerebro porcino)
- Colesterol (de lana ovina)
- 1,2,-dioleoil-sn-glicerol-3-{succinil [acido N-(5-amino-1-carboxilpentil)] iminodiacético} funcionalizado con Níquel : DOGS-NTA-Ni

La composición lipídica y la proporción de cada lípido viene especificada en la siguiente tabla 4 y se basa en la composición de los exosomas naturales analizada previamente en nuestro laboratorio (Aguiló J.I et al. Manuscrito en preparación).

Tabla 4: Composición lipídica de los liposomas

Lípido	Peso Molecular (g/mol)	Porcentaje en peso
Fosfatidil-colina	760,09	55
Esfingomielina	731,09	30
Colesterol	386,66	10
DOG5-NTA-Ni	1.057,02	5

En la figura 6 se esquematiza la generación de las vesículas lipídicas de tipo LUV.

Figura 6.

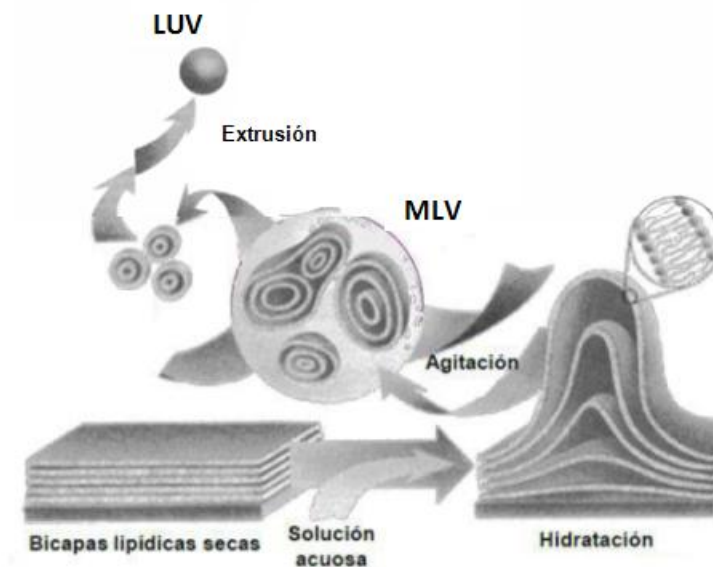


Figura 6: Esquema de la generación de vesículas lipídicas tipo LUV (adaptada de *Avanti Polar Lipids*).

Tras mezclar en un tubo *Eppendorf* las cantidades correspondientes de cada lípido fue necesario llevar a cabo la evaporación del disolvente (metanol y cloroformo 1:2). Primero se inyectó una corriente de nitrógeno durante 10 minutos de forma que se eliminó la mayor parte del disolvente. Posteriormente la mezcla se sometió a vacío

durante 12 horas en un concentrador. Una vez obtenidas las laminas lipídicas secas en el fondo de los tubos, se hidrataron con PBS (500 μL / *Eppendorf*) formándose unas vesículas denominadas MLV (*Multi Lamellar Vesicles*). Estas MLVs fueron sometidas a un proceso de extrusión durante 10 ciclos empleando un *Extruder (Northern Lipids)*. Gracias a él se eliminaron las capas lipídicas externas al pasar los MLVs por dos filtros de policarbonato con un diámetro de poro de 200 nm (*Whatman*), obteniéndose los LUV. Para su posterior uso en cultivos celulares fue necesario esterilizarlos mediante un filtro de 0,22 μm (*Sartorius*).

6.2.2. Incubación de LUV con TRAIL

Una vez generados los LUV es necesario incubarlos con TRAIL en la proporción y condiciones adecuadas para lograr su unión y así obtener LUV-TRAIL. En trabajos anteriores se optimizó la proporción de lípido quelante (DOGS-NTA-Ni) en los LUV (5%) y la relación proteína:lípido más adecuada (1:100). Dado que los LUV se preparan a una concentración de 5 mM y la concentración final a la que se emplean para incubarlos con TRAIL es de 2,5 mM, se deben diluir 1/2. Para mantener la relación molar entre el lípido quelante y TRAIL, la concentración óptima de TRAIL debe ser 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ³³.

Se procedió a realizar los cálculos para cada componente teniendo en cuenta las proporciones anteriores (V final=1ml):

- LUV: La mitad del volumen final de LUV-TRAIL.(500 μl)
- TRAIL-*His*₁₀: La cantidad necesaria para que la concentración final fuera 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$. (240 μl del stock 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de TRAIL)
- Tampón PBS: El necesario hasta completar el volumen final establecido (260 μl)

Las cantidades necesarias de cada componente, se mezclaron en un tubo *Eppendorf* que se incubó en un bloque seco orbital (*Thermomixer, Eppendorf*) a 37°C, en agitación (850 rpm) durante 30 minutos. Conservándose a 4°C hasta su uso.

6.3. CULTIVOS EN 3D : CHIPS POLIESTIRENO

Para los diferentes ensayos llevados a cabo en 3 dimensiones usamos chips de poliestireno creados por el grupo GEMM. Para generar un Sistema 3D se embebieron las células en un hidrogel de colágeno.

6.3.1. Elaboración del hidrogel de colágeno

El colágeno posee características que hay que tener en cuenta para llevar a cabo la preparación de la matriz de hidrogel. El colágeno a pH ácido es soluble, sin embargo neutralizado y polimeriza muy rápido a temperatura ambiente.

La reacción de polimerización en frío es muy lenta y puede permanecer en estado líquido 2-3 horas. Por lo tanto, hasta su introducción en los chips se trabajó con los reactivos en hielo, evitando su polimerización antes de lo deseado.

Gracias a los pilares y a la tensión superficial, al inyectar el hidrogel en la microcámara central, quedó confinado en ésta sin invadir los canales laterales.

Figura 7.

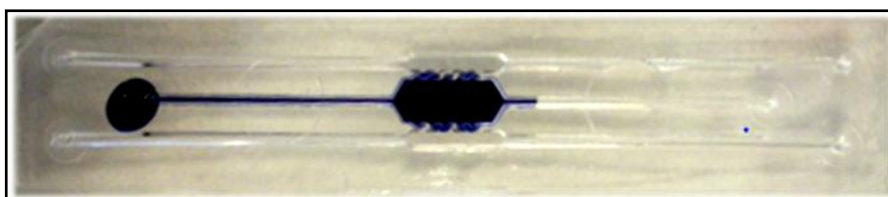


Figura 7: Chip con colorante confinado en la cámara central.

Una vez incorporado el hidrogel al canal central se depositó en el incubador 37°C durante 15 minutos, para permitir el proceso de polimerización y crear una matriz 3D.

Para la preparación de 100 µl de hidrogel de colágeno tipo 1 de cola de rata (concentración final de 1,5mg/mL) se mezclaron los siguientes componentes en el orden indicado:

- 2) DMEM 5X: 1/5 del volumen total. Necesario para ajustar la concentración de iones (*Sigma*)
- 3) Sosa 1N: neutraliza el pH ácido del colágeno para que se lleve a cabo la reacción de polimerización. Para ello 1/40 del volumen del colágeno debe ser NaOH: 1,25 µl. (*Sigma*)

- 4) Colágeno tipo 1 de cola de rata (3mg/ml): para conseguir la concentración final indicada y teniendo en cuenta la concentración del stock era necesario que la mitad del volumen final del hidrogel fuese colágeno: 50 μ l. (Corning)
- 1) Agua: la cantidad necesaria para obtener el volumen final: 27 μ l.

6.3.2. Difusión dextrano fluorescente (\approx TRAIL) Y LUV-TRAIL-rho

Con esta técnica estudiamos la difusión de las distintas moléculas de forma pasiva por la matriz de hidrogel.

Una vez creada la matriz de colágeno se introdujo un dextrano de 70 kDa conjugado con-TRITC (*Isotiocianato tetrametil de rodamina, labs/lem: 557/576nm*) por un canal lateral a 15mM. El dextrano es un polisacárido complejo, que representa la forma activa de TRAIL soluble (trímero). La visualización de la difusión fue fotografiada a diferentes tiempos con el uso de un microscopio *Nikon Eclipse Ti-E* con un módulo confocal C1.

Figura 8.

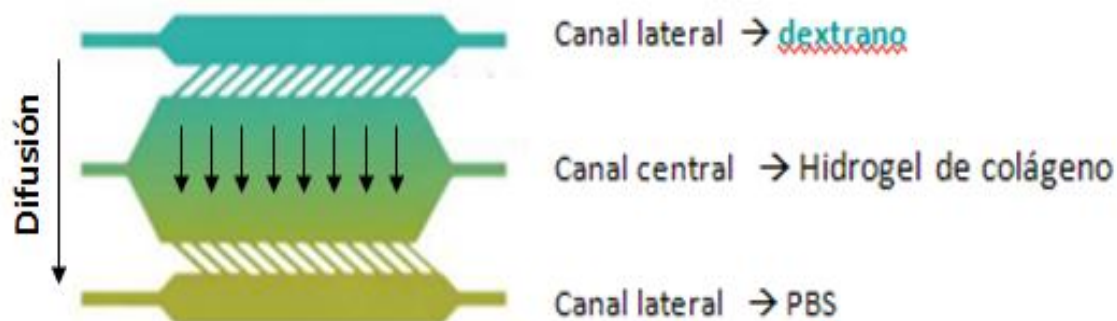


Figura 8: Imagen esquematizada de la difusión en un chip microfluídico.

Para observar la difusión de LUV-TRAIL se crearon LUV rojos fluorescentes especiales en cuya composición está incorporada la fosfatidil-etanolamina unida a rodamina (PE-Rho).

6.4. ESTUDIOS CITOTOXICIDAD Y APOPTOSIS TRAIL VS LUV- TRAIL

6.4.1. Cultivos celulares convencionales

6.4.1.1. Viabilidad celular

El método MTT desarrollado por *Mosmann* en 1983 y posteriormente modificado en 1986 por *Francois Denizot* y *Rita Lang* es útil en la determinación del efecto citotóxico de distintas sustancias sobre líneas celulares tumorales³⁴. Es un método colorimétrico basado en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, MTT (*Sigma*) colorante amarillo pálido, soluble en agua, en un compuesto coloreado de color azul, insoluble, denominado azul de formazán. Esta reacción es llevada a cabo por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. Es un método preciso y rápido para medir la proliferación celular e indirectamente la muerte celular ya que el número de células vivas es proporcional a la cantidad de azul de formazán producido.

Se cultivaron 25.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano y se añadió concentraciones crecientes de TRAIL y LUV-TRAIL con volumen final 100 µl en cada pocillo. Se cultivaron 24 horas y se procedió a la incorporación de 10 µl a cada pocillo de una disolución MTT (5 mg/ml) preparada en PBS. Las placas se incubaron entre 2 y 3 horas a 37°C. Una vez formados los cristales de azul de formazán se centrifugo la placa durante 10 minutos, a 3.500 rpm para poder eliminar 70 µl del sobrenadante sin retirar los cristales que se depositaron en el fondo. Los cristales de azul de formazán se agitaron en 50 µL de isopropanol/pocillo en una placa vibradora (*Bioblock*) para disolverlos.

Finalmente se midió la absorbancia de los pocillos a 550 nm en un lector de placas ELISA MR5000 (*Dynatech*). Los resultados se representaron como el porcentaje de crecimiento de las células expuestas a las distintas concentraciones de la droga respecto al control de células no tratadas:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{DO \text{ células tratadas}}{DO \text{ células control}} \times 100$$

6.4.1.2. Citometría de flujo

Para cuantificar el porcentaje de apoptosis frente a distintos tratamientos se realizó un marcaje celular con anexina V y 7AAD (amino-actinomicina D).

La translocalización de la fosfatidil-serina a la cara externa de la membrana plasmática es uno de los eventos tempranos para detectar la apoptosis. Este cambio de localización es detectable empleando de anexina V, proteína que se une específicamente a la fosfatidil-serina en una reacción dependiente de calcio. La anexina V se puede asociar a diferentes fluorocromos como la PE (*ficoeritrina*, *labs/lem: 495/578nm*) o FITC (*Isotiocianato de fluoresceina*, *labs/lem: 494/518nm*).

En estadios tardíos de apoptosis, la membrana plasmática pierde su integridad y el DNA se hace accesible a moléculas fluorescentes que se intercalan en él, como el 7-AAD. Tanto la anexina V como 7-AAD fueron detectados mediante citometría de flujo empleando un citómetro FAC Calibur (*Becton & Dickinson*) y procediendo a su posterior análisis con el software FlowJo v 7.6.1.

Se sembraron 25.000 células/pocillo cultivadas con diferentes concentraciones crecientes de TRAIL y de LUV-TRAIL y se realizaron 2 puntos experimentales a dosis máximas (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a las que se les añadieron RIK 2 (*BD-Pharmingen*), y z-VAD-fmk (*Bachem*). RIK es un anticuerpo monoclonal bloqueante de TRAIL que se incubó con TRAIL y LUV-TRAIL durante 1 hora y la mezcla se añadió al cultivo celular. z-VAD-fmk inhibidor general de caspasas, se incubó 1 hora con el cultivo celular tras lo cual se añadió TRAIL o LUV-TRAIL. A las 24 horas se realizó el doble marcaje de las células, para lo cual se recogieron los sobrenadantes (donde se encontraban las células muertas) que se pasaron a una placa de 96 pocillos de fondo redondo. El resto de las células se tripsinizaron, se recogieron y se unificaron con sus correspondientes sobrenadantes. Se decantaron las células mediante centrifugación (1 minuto, 4.000 rpm) para eliminar el sobrenadante mediante una inversión rápida y se adicionó a cada punto 50 μl de ABB (*Annexin Binding Buffer*) conteniendo 2 μl de anexina V y 0,5 μl de 7-AAD. Las células se incubaron durante 15 minutos en oscuridad, se resuspendieron, se trasvasaron a un tubo de citometría y se analizó la muerte celular en el citómetro de flujo.

6.4.1.3. Hoechst 33342

Una preparación celular teñida con *Hoechst 33342* (*Sigma, labs/lem: 350/461nm*), es útil para visualizar los cambios morfológicos nucleares típicos que se producen durante el proceso de apoptosis. El colorante fluorescente *Hoechst 33342* se intercala en el surco menor del ADN y puede ser visualizado con un microscopio de fluorescencia detectando la condensación y fragmentación nuclear en el proceso de apoptosis.

Para llevar a cabo la tinción con *Hoechst 33342* se añaden tantos cubres como puntos experimentales a una placa ELISA DE 24 pocillos, sobre ellos se sembraron 150.000 células dejando que se adhirieran al cubre. Al día siguiente se añadió TRAIL y LUV-TRAIL a dosis máximas (1 µg/µl) con sus respectivos controles (células sin tratar). Al día siguiente se aspiró todo el sobrenadante, se fijaron las células con paraformaldehído y se retiró los cubres de los pocillos de la placa ELISA. Los cubres fueron sumergidos durante unos 5 segundos en un tubo con PBS para realizar un lavado. Se añadió una gota de *Hoechst 33342* con moviol (20 µg/µl) sobre el porta y finalmente se depositó sobre la gota el cubre poniendo en contacto las células con el *Hoechst 33342*. Finalmente la tinción fue visualizada con el microscopio de fluorescencia (*Nikon*) y almacenada a 4°C.

6.4.1.4. Ensayo Clonogénico

El ensayo clonogénico es útil para el estudio de la citotoxicidad a largo plazo de agentes específicos mediante la observación del número de clones que se desarrollan a partir de una célula.

Se sembraron 5.000 células/pocillo en una placa ELISA de 6 pocillos con un volumen final de 2 ml por pocillo. Se añadieron las concentraciones máximas (1 µg/ml) de TRAIL y LUV-TRAIL por duplicado y sus correspondientes controles. A las 24 horas se eliminó el sobrenadante y se añadió medio completo. El cultivo se dejó crecer hasta que formaron colonias (7-15 días). Posteriormente, las colonias fueron fijadas con metanol durante 15-20 minutos tras lo cual se sustituyó por cristal violeta durante 15-20 minutos. El cristal violeta sobrante fue eliminado mediante un lavado suave sumergiendo la placa en agua. Una vez que la placa estuvo seca se diluyó el colorante

internalizado en las células en DMSO y se midió la coloración en el lector de placas ELISA MR5000 (*Dynatech*) a 550 nm.

6.4.2. Cultivos celulares en 3 Dimensiones

El cultivo 3D en chip se preparó según el protocolo 6.3.1. con pequeñas modificaciones:

- DMEM 5X: 1/5 del volumen que no posee células. Es necesario para ajustar la concentración de iones: 13,36 μ l
- Sosa 1N: 3 μ l
- Colágeno tipo 1 (3mg/ml): 50 μ l
- Suspensión celular: 33,2 μ l, partiendo de una concentración celular adecuada para tener una concentración final dentro del chip de 3×10^6 células/ml.

La suspensión celular se añadió siempre en último lugar, para evitar dañar las células durante la adición de los mencionados reactivos.

Una vez creado el cultivo celular en 3D se incorporó por ambos canales laterales los diferentes agentes citotóxicos. Se dejó el cultivo 48 horas y se visualizó con un microscopio *Nikon Eclipse Ti-E* con un módulo confocal C1. Gracias a la incorporación de IP (ioduro de propidio, *abs/em: 535/617 nm; Sigma*), que tiñe los núcleos de las células muertas en color rojo mientras que es incapaz de marcar las sanas, se pudo visualizar la mortalidad celular. También se tiñeron con calceína (*Sigma*) para poder detectar las células vivas (*abs/em: 455/515 nm*), compuesto que no es fluorescente pero por la actividad de las esterasas celulares es transformada en un compuesto fluorescente verde.

Figura 9.



Figura 9: Esquema ensayo citotoxicidad en chips microfluídicos.

6.5. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

6.5.1. Extracción y fraccionamiento de lisados celulares

Para realizar los lisados celulares se sembraron 5×10^6 células en placas de *Petri* y se añadieron TRAIL, LUV-TRAIL (concentración 1000 ng/ μ l) y sus controles. Al día siguiente las células fueron tripsinizadas, y recolectadas mediante centrifugación durante 5 minutos a 1.500 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 100 μ l de tampón de lisis (triton X-100 al 1% (v/v), tris/HCl 50mM pH 7,6, EDTA 1 mM, ortovanadato sódico 1 mM, pirofosfato sódico 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonio 1mM, fluoruro de sodio 10 mM, leupeptina 1 mM, cloruro de sodio 150 mM y glicerol al 10% (v/v)). Posteriormente se incubaron las células durante 20 minutos a 4°C y se volvieron a centrifugar durante 30 minutos a 14.000 rpm a 4°C. El sobrenadante donde se encuentran las proteínas celulares fue recogido en un *Eppendorf* limpio y almacenado a -20°C hasta su utilización.

6.5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

Para cargar la misma cantidad de proteína en cada uno de los pocillos se midió la cantidad de proteína que se encontraba en cada lisado celular mediante el método del BCA (ácido bicinconínico, *Micro BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific*), un método colorimétrico, muy sensible y con poca interferencia.

Una vez igualada la cantidad de proteína en cada lisado celular se añadió 50 μ l de un tampón de carga concentrado 3x (tris/HCl 150mM pH 7,4, SDS al 3%, molibdato de sodio 0,3mM, pirofosfato sodico 30 mM, fluoruro de sodio 30mM, glicerol al 30% (v/v), β -mercaptoetanol al 30% (v/v) y azul de bromofenol al 0,06% (p/v)). Finalmente los lisados celulares se calentaron a 100°C en un bloque seco (*Selecta*) durante 5 minutos y se cargaron en un gel 12% poliacrilamida con SDS (dodecil sulfato sódico). La composición del gel de resolución fue: acrilamida/bis al 30% (*Hoefler*), tris-HCl 1,5M pH 8,8, SDS al 10%, persulfato amónico al 10%, TEMED al 0,01%. La composición del tampón de carrera contenía tris base 25mM, glicina 192 mM y SDS 3.5mM. .

La separación de proteínas en función del peso molecular se realizó mediante electroforesis en una cubeta de *Hoefler* a 80 V durante 10 minutos y 180 V hasta

concluir la carrera. Se usaron marcadores pesos moleculares estándares (*Broad Range Protein Ladder, Spectra™ Multicolor*) para ubicar las proteínas a estudiar.

6.5.3. Transferencia de proteínas a membranas

Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de polivinilo difluorido (PVDF, *Hybond C-extra, Amersham*) utilizando un tampón de transferencia con la siguiente composición: tris(hidroximetil)aminometano 25mM pH 8,3, glicina 192mM, SDS 3.5mM. La transferencia se realizó en un equipo de transferencia semi-seca (*Bio-Rad*) a 20 V y 400 mA, durante 60 minutos.

6.5.4. Análisis de proteínas por *Western Blot*

Las proteínas fijadas en las membranas de PVDF se analizaron con la ayuda de anticuerpos específicos. La membrana de PVDF se bloqueó con leche desnatada en polvo al 5% (p/v), disuelta en PBS, durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Luego se lavó 3 veces durante 5 minutos con una solución de lavado que contenía: NaCl 0,12M, tris/HCl 10mM pH 8,0, Tween 20 al 0,1% (p/v) en PBS pH 7,4, denominado PBS-Tween 20. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario específico (diluido en PBS Tween 20 con leche desnatada en polvo al 2%) para detectar la proteína deseada durante toda la noche. Los anticuerpos primarios empleados fueron los siguientes:

<u>Anticuerpos</u>	<u>Especie de origen</u>	<u>Concentración ($\mu\text{g/ml}$)</u>	<u>Proveedor</u>
Caspasa 8	ratón	0,750	<i>BD Pharmingen</i>
Caspasa 3	conejo	0,1	<i>R&D Systems</i>
Bid	conejo	0,1	<i>Cell Signaling</i>
Actina	ratón	0,1	<i>Sigma</i>

Finalizada la incubación, la membrana se lavo en PBS-Tween 20, 3 veces durante 10 minutos en agitación y luego se incubó con un anticuerpo secundario diluido en PBS-Tween 20 con leche desnatada en polvo al 1%, a la concentración especificada por el fabricante durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación suave.

Los anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa o fosfatasa alcalina reconocen específicamente la fracción Fc de las IgGs de la especie en la que había sido generado

el anticuerpo primario. Estos anticuerpos secundarios procedieron de *Sigma*. Se retiró la solución de anticuerpo secundario y se lavó la membrana con PBS-Tween 20, 3 veces durante 10 minutos en agitación.

La detección de los inmunocomplejos se realizó mediante una solución de revelado usando el kit *Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific)*. El tiempo de revelado dependió de la cantidad de muestra aplicada y de la sensibilidad del anticuerpo primario utilizado.

6.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para todos los estudios de comparación entre variables cuantitativas ha sido aplicado el test de la *t* de *Student*. Los datos que se muestran corresponde a la media \pm error estándar típico (SEM).

En todos los casos, se ha considerado como significativamente estadístico una valor de $p < 0,05$. Los datos estadísticos han sido analizados usando el *software Excel 2007 (Microsoft)*.

7. Resultados

El estudio citotóxico de TRAIL soluble y LUV-TRAIL se llevo a cabo en dos líneas celulares con diferente resistencia a descrita a TRAIL. Mientras que la línea celular A549 presenta una elevada resistencia a TRAIL, las células Caki-1 son sensibles a TRAIL soluble. Para analizar la capacidad citotóxica de los LUV-TRAIL en comparación con la forma soluble de TRAIL, se llevo a cabo ensayos dosis-respuesta que se analizaron por citometría de flujo, ensayo de reducción del MTT, ensayos clonogénicos y tinción con *Hoechst*. También se analizó la activación de la vía de la apoptosis mediante *Western blot*. Finalmente, además de estos estudios sobre cultivos celulares tradicionales, se realizaron ensayos en chips de poliestireno con cultivos tridimensionales.

7.1. EFECTO DE LUV-TRAIL SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER DE PULMÓN (A549)

La línea celular A549 se desarrolló por primera vez en 1972 a través de la extracción y cultivo de tejido pulmonar canceroso de un varón de 58 años de edad caucásico. Es una línea celular que presenta una gran resistencia a TRAIL soluble.

7.1.1. Efecto citotóxico de LUV-TRAIL

El método de reducción del MTT permite medir la proliferación celular e indirectamente la muerte celular (figura 10. A). Con la citometría de flujo se cuantifica el porcentaje de células apoptóticas marcadas con anexina V (figura 10. B).

En ambos experimentos la mortalidad de las células tumorales A549 es superior con los LUV-TRAIL frente a TRAIL soluble, siendo la diferencia estadísticamente significativa a dosis máximas. Cuando se lleva a cabo la pre-incubación con RIK (anticuerpo bloqueante de TRAIL), los niveles de mortalidad se reducen prácticamente a los niveles del control.

Con el empleo de TRAIL se induce apoptosis en el 15 % de la células tumorales mientras que con el uso de los LUV-TRAIL este porcentaje aumenta hasta el 35%.

Figura 10.

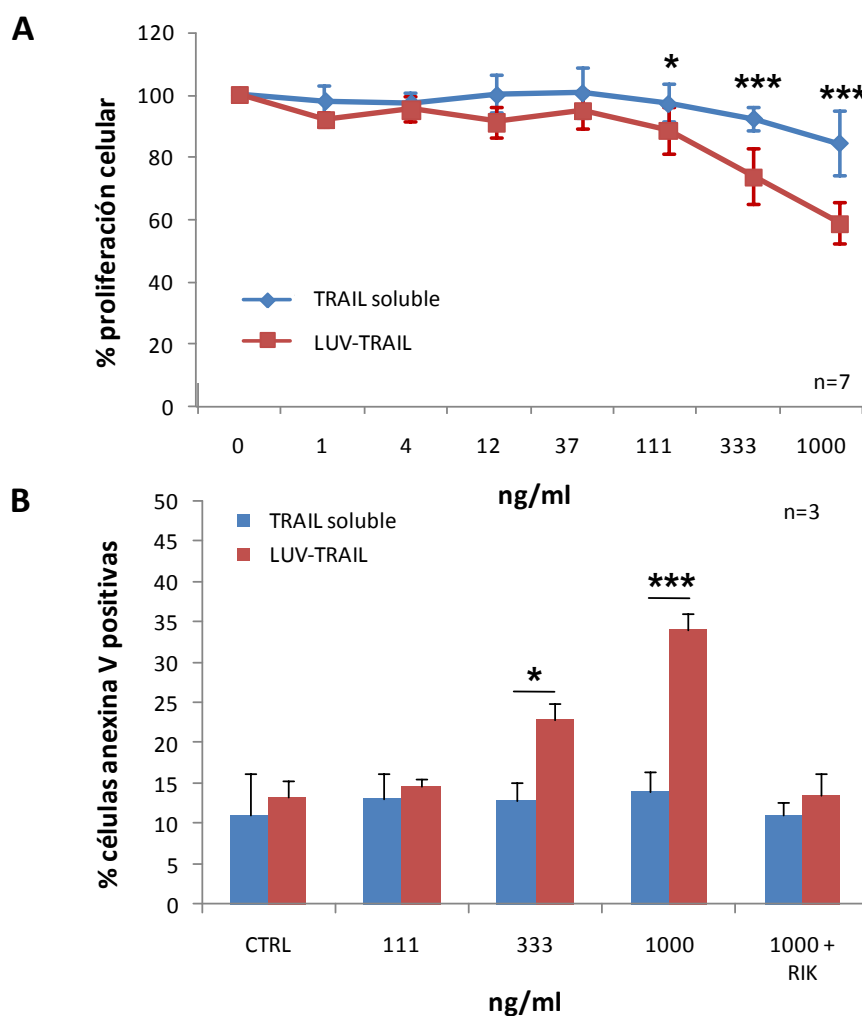


Figura 10: A) Efecto de TRAIL soluble y LUV-TRAIL en la proliferación celular de las células A549. Las células se trataron con las dosis indicadas de TRAIL soluble (azul) y de LUV-TRAIL (rojo) durante 24 horas. La proliferación celular se analizó mediante el ensayo de reducción del MTT. La gráfica muestra la media \pm desviación estándar del porcentaje de proliferación celular respecto al control de 5 experimentos independientes. * $p < 0,05$. **B) Representación de los niveles de apoptosis observados mediante marcaje con anexina-V-FITC y posterior análisis por citometría.** La gráfica muestra la media \pm desviación estándar del porcentaje de células apoptóticas (anexina V +) de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Además de analizar la capacidad citotóxica de LUV-TRAIL en comparación con TRAIL soluble a corto plazo, se llevó a cabo un ensayo clonogénico para estudiar la capacidad citotóxica de los LUV-TRAIL a largo plazo. Tal y como se observa en la figura 11, los LUV-TRAIL fueron capaces de inhibir la formación de colonias en las células A549 de una forma más eficiente que TRAIL soluble indicando que los LUV-TRAIL no sólo presentan una mayor capacidad citotóxica que TRAIL soluble a corto plazo (ensayo de reducción del MTT y de citometría de flujo) sino que también presentan una mayor capacidad citotóxica a largo plazo comparados con la forma soluble de TRAIL.

Figura 11.

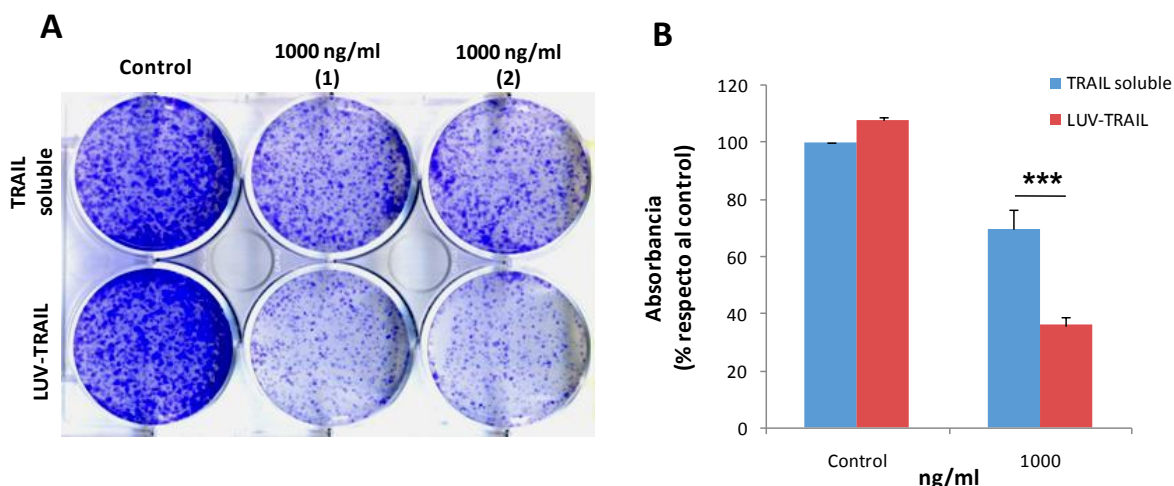


Figura 11: A) Fotografía del ensayo clonogénico realizado sobre las células A549. Tras sembrar las células y dejar que se adhirieran a la placa de cultivo, se trataron con 1000 ng/ml de TRAIL soluble y LUV-TRAIL. Tras 24 horas se retiró el medio de cultivo que contenía TRAIL y las células se cultivaron durante 10 días en estufa. Finalmente las células se fijaron con metanol y se tiñeron con cristal violeta. B) El colorante captado por las células se diluyó en DMSO y se midió la coloración en el lector de placas a 550 nm. La gráfica muestra la media \pm desviación estándar del porcentaje de la absorbancia en los dos pocillos tratados con TRAIL y LUV-TRAIL respecto al control. *** $p < 0,001$.

7.1.2. Cambios morfológicos nucleares tras el tratamiento con los LUV-TRAIL

Mediante la tinción de *Hoechst* se observaron los cambios morfológicos típicos que se producen en el núcleo celular cuando las células sufren un proceso de apoptosis en este caso tras el tratamiento con TRAIL soluble y LUV-TRAIL (figura 12. A). Además se analizó de forma paralela la muerte celular mediante tinción con 7-AAD y anexina V y análisis mediante citometría de flujo (figura 12. B).

Tal y como se observa con la tinción de *Hoechst*, tras el tratamiento con TRAIL soluble los LUV-TRAIL los núcleos de las células A549 presentan los cambios típicos de una muerte por apoptosis como condensación nuclear, fragmentación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos. Estos cambios fueron más evidentes tras el tratamiento con los LUV-TRAIL lo que se correlaciona con la muerte celular analizada en paralelo. Al igual que en el experimento anterior, al usar el anticuerpo bloqueante RIK tanto los cambios morfológicos como los niveles de muerte vuelven a los valores basales.

Figura 12.

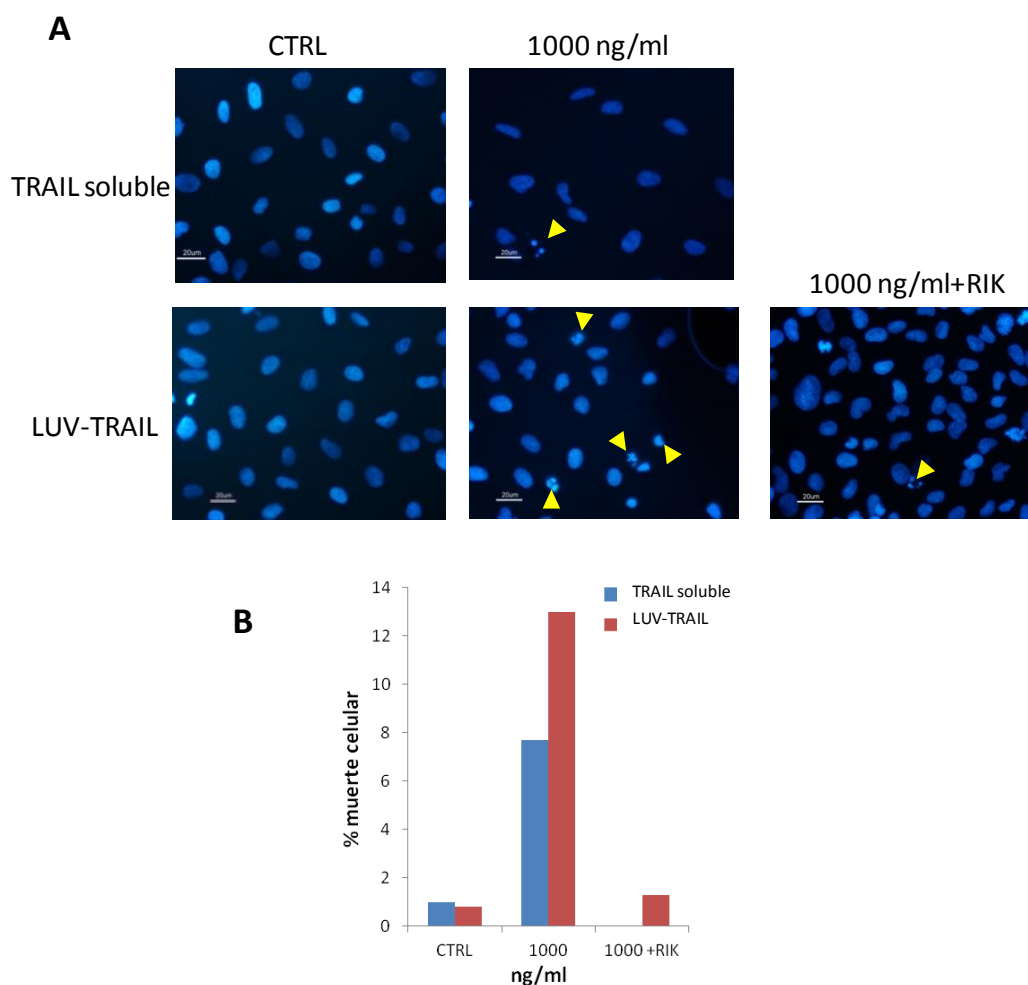


Figura 12: A) Cambios morfológicos nucleares tras el tratamiento con TRAIL soluble y LUV-TRAIL en las células A549. Las células se trataron con las 1000 ng/ml de TRAIL soluble (azul) y de LUV-TRAIL durante 12 horas. Posteriormente las células se tiñeron con Hoechst 33342 y se visualizaron al microscopio de fluorescencia. Aumento original 200x. B) En paralelo, se trataron células A549 con las mismas dosis de TRAIL soluble y LUV-TRAIL y tras 12 horas se analizó la muerte celular mediante citometría de flujo tras haber realizado el marcaje con 7-AAD y anexina V.

7.1.3. Activación de las caspasas tras el tratamiento con los LUV-TRAIL

Una vez comprobado el mayor potencial citotóxico de los LUV-TRAIL y dado que la muerte celular inducida por éstos presentaba características típicas de apoptosis, se analizó por *Western blot* la activación de las caspasas 8 y 3 así como de Bid, proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2 que tal y como se ha indicado (ver Introducción) conecta ambas vías de la apoptosis responsable de activar la vía intrínseca de la apoptosis (figura 13).

Figura 13.

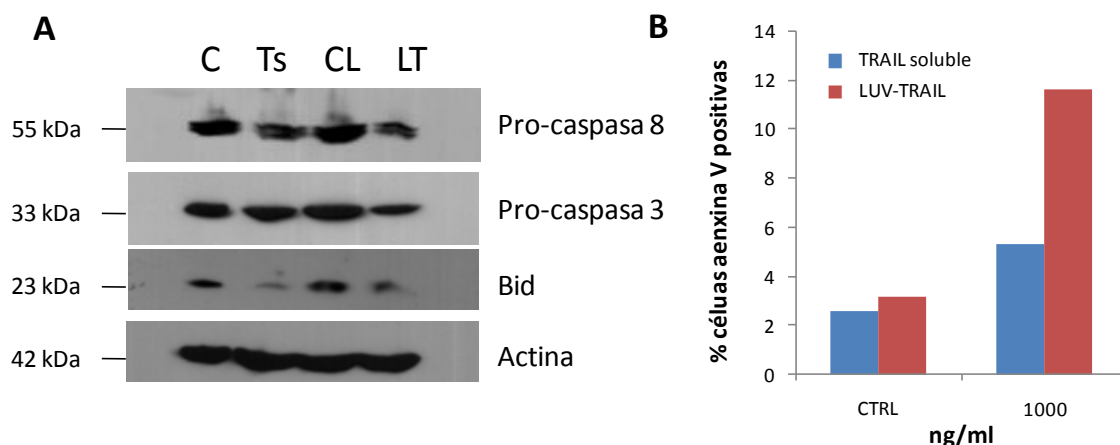


Figura 13: A) Análisis de la expresión de proteínas implicadas en la apoptosis tras el tratamiento con los LUV-TRAIL en las células A549. Las células no se trataron (C) o fueron tratadas con LUVs sin TRAIL acoplado a su superficie (CL), con 1000 ng/ml de TRAIL soluble (Ts) y con 1000 ng/ml de LUV-TRAIL (LT) durante 12 horas, tras lo cual se realizaron los extractos citosólicos en los que las proteínas se separaron mediante electroforesis y se transfirieron a una membrana de PVDF. La expresión de caspasa 8, caspasa 3 y Bid se analizó incubada la membrana con anticuerpos específicos. B) Antes de realizar los lisados celulares se tomó una alícuota de cada punto experimental. En paralelo, se trataron células A549 con las mismas dosis de TRAIL soluble y LUV-TRAIL y se analizó la muerte celular por citometría de forma paralela a los lisados mediante marcaje con anexina-V-FITC.

Como se puede observar en la figura 13 A, el tratamiento de las células A549 con LUV-TRAIL produjo un mayor descenso de las formas pro-activas de caspasa 8 y caspasa 3 que la forma soluble de TRAIL. No se observaron diferencias en el procesamiento de Bid. Además, este mayor descenso de la pro-caspasa 8 y de la pro-caspasa 3 inducido por los LUV-TRAIL se correlaciona con un mayor porcentaje de muerte celular (figura 13. B).

7.1.4. Inhibición de la citotoxicidad inducida por los LUV-TRAIL con inhibidor de caspasas z-VAD

Para determinar definitivamente que la muerte celular inducida por los LUV-TRAIL en la línea celular A549 se produce mediante el mecanismo de apoptosis dependiente de caspasas, se estudió mediante citometría de flujo el efecto del inhibidor general de caspasas (z-VAD) en la capacidad citotóxica de los LUV-TRAIL (figura 14).

Figura 14.

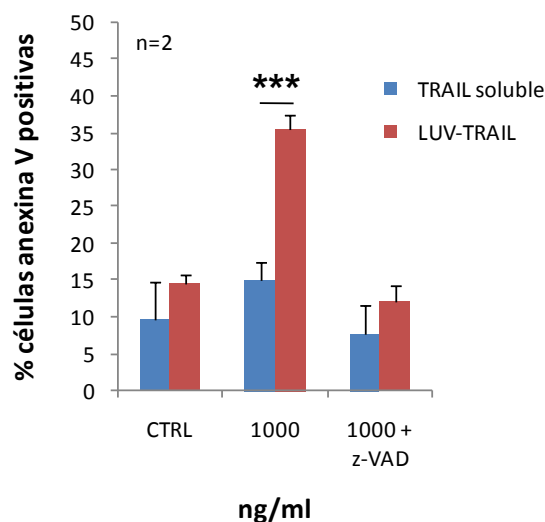


Figura 14: Ensayo de inhibición de la muerte celular en las células A549. Las células fueron tratadas con 1000 ng/ml de TRAIL soluble o LUV-TRAIL tras haberlas pre-incubado o no durante 1 hora con el inhibidor general de caspasas z-VAD. Tras 24 horas se analizó la muerte celular mediante citometría de flujo. La gráfica muestra los niveles de apoptosis observados mediante marcaje con anexina-V-FITC de 2 experimentos independientes. *** $p < 0,001$.

Tal y como se observa en la figura 14, la pre-incubación de las células A549 con el inhibidor general de caspasas z-VAD redujo la muerte celular tanto de TRAIL soluble como de los LUV-TRAIL hasta los niveles basales.

7.2. EFECTO DE LUV-TRAIL SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER RENAL (Caki-1)

La línea celular Caki-1 son células tumorales extraídas de un carcinoma renal de células claras que se estableció en 1971 de un varón metastásico (con afectación también en piel) de 49 años de edad. En estudios anteriores se ha visto que las células Caki-1 son sensibles a TRAIL soluble.

7.2.1. Efecto citotóxico de LUV-TRAIL

Al igual que con la línea celular A549 se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad de TRAIL y LUV-TRAIL sobre las Caki-1 en cultivos celulares convencionales.

Se analizó la proliferación celular con el método de reducción del MTT (figura 15. A) y se valoró el porcentaje de células apoptóticas mediante citometría de flujo cuantificando el porcentaje de células anexina V positivas (figura 15. B).

Los resultados revelan una mortalidad celular elevada tanto con el uso de TRAIL soluble como de los LUV-TRAIL. Ambas gráficas muestran la mayor eficacia de LUV-TRAIL que llegan a matar casi el 80% de las células Caki-1. La diferencia en la capacidad citotóxica de los LUV-TRAIL y TRAIL es estadísticamente significativa en el ensayo de proliferación celular a las cuatro dosis más altas empleadas. En cuanto a la cuantificación de la muerte aunque el porcentaje de células muertas siempre fue superior con el uso de los LUV-TRAIL, sólo se observó diferencias estadísticamente significativa a la dosis de 111 ng/ml.

Figura 15.

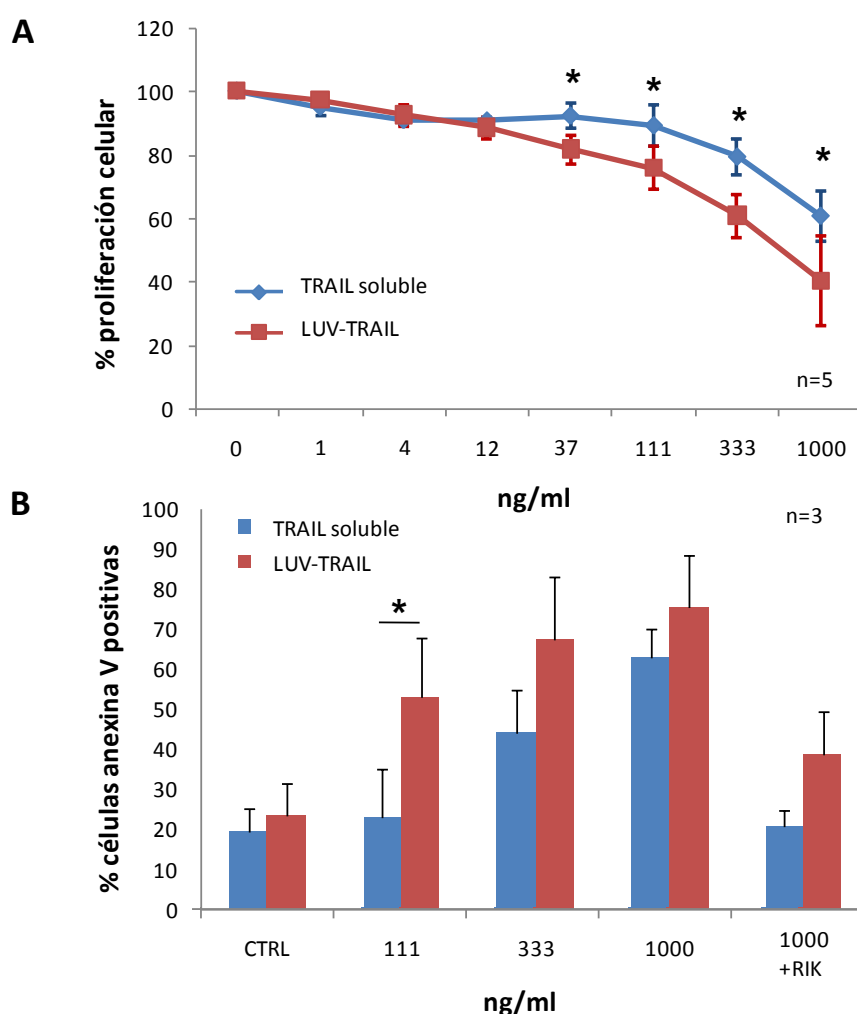


Figura 15: A) Efecto de TRAIL soluble y LUV-TRAIL en la proliferación celular de las células Caki-1. Las células se trataron con las dosis indicadas de TRAIL soluble (azul) y de LUV-TRAIL (rojo) durante 24 horas. La proliferación celular se analizó mediante el ensayo de reducción del MTT. La gráfica muestra la media \pm desviación estándar del porcentaje de proliferación celular respecto al control de 5 experimentos independientes. * $p < 0,05$. B) Representación de los niveles de apoptosis observados mediante marcaje con anexina-V-FITC y posterior análisis por citometría. La gráfica muestra la media \pm desviación estándar del porcentaje de células apoptóticas (anexina V +) de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$.

Al igual que en las células A549 la citotoxicidad observada en las células Caki-1 es específicamente debida a TRAIL ya que cuando se lleva a cabo la pre-incubación con RIK (anticuerpo bloqueante de TRAIL), los niveles de mortalidad se reducen prácticamente a los niveles del control.

Para estudiar la capacidad de los LUV-TRAIL a largo plazo se llevo a cabo un ensayo clonogénico. Como se observa en la Figura 16, tanto TRAIL soluble como los LUV-TRAIL presentaron una gran capacidad de inhibir el crecimiento de colonias a largo plazo en las células Caki-1.

Figura 16.

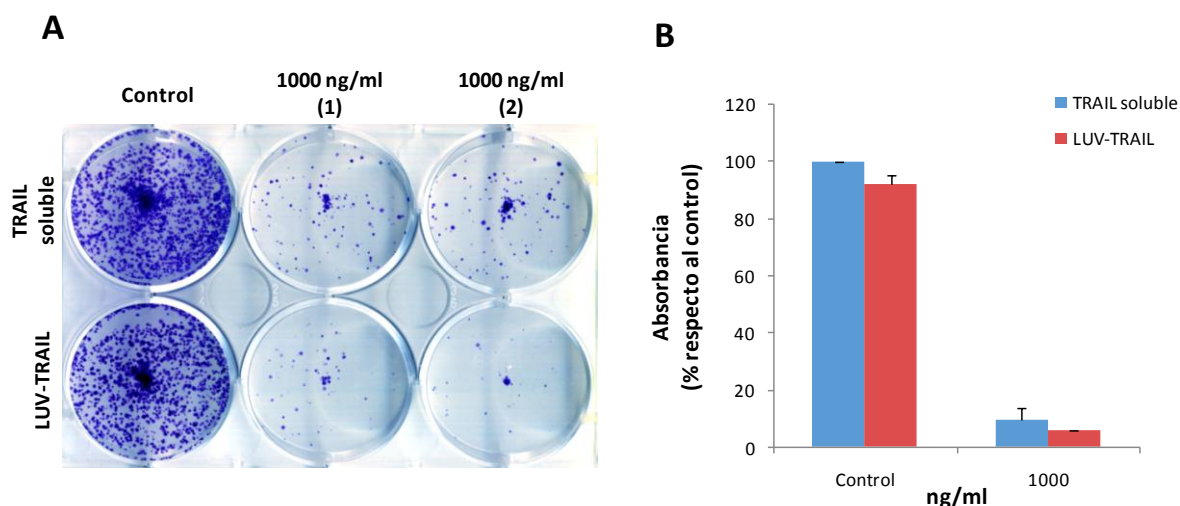


Figura 16: A) Fotografía del ensayo clonogénico realizado sobre las células Caki-1. Tras sembrar las células y dejar que se adhirieran a la placa de cultivo, se trataron con 1000 ng/ml de TRAIL soluble y LUV-TRAIL. Tras 24 horas se retiró el medio de cultivo que contenía TRAIL y las células se cultivaron durante 10 días en estufa. Finalmente las células se fijaron con metanol y se tiñeron con cristal violeta. B) El colorante captado por las células se diluyó en DMSO y se midió la coloración en el lector de placas a 550 nm La gráfica muestra la media \pm desviación estándar del porcentaje de la absorbancia en los dos pocillos tratados con TRAIL y LUV-TRAIL respecto al control.

7.2.2. Cambios morfológicos nucleares tras el tratamiento con LUV-TRAIL

Los cambios nucleares típicos que se producen en el proceso de apoptosis también fueron analizados en las células Caki-1 mediante la tinción de *Hoechst* tras el tratamiento con TRAIL soluble y LUV-TRAIL (figura 17. A). Además de forma paralela se

analizó la muerte celular mediante tinción con 7-AAD y anexina V y análisis por citometría de flujo (figura 17. B).

Tras el tratamiento con TRAIL soluble y LUV-TRAIL los núcleos de las células Caki-1 presentan condensación nuclear, fragmentación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos. Estos cambios fueron más presentes tras el tratamiento con LUV-TRAIL lo que se correlaciona con la muerte celular analizada en paralelo. Al igual que en el experimento anterior, al usar el anticuerpo bloqueante RIK tanto los cambios morfológicos como los niveles de muerte vuelven a los valores basales.

Figura 17.

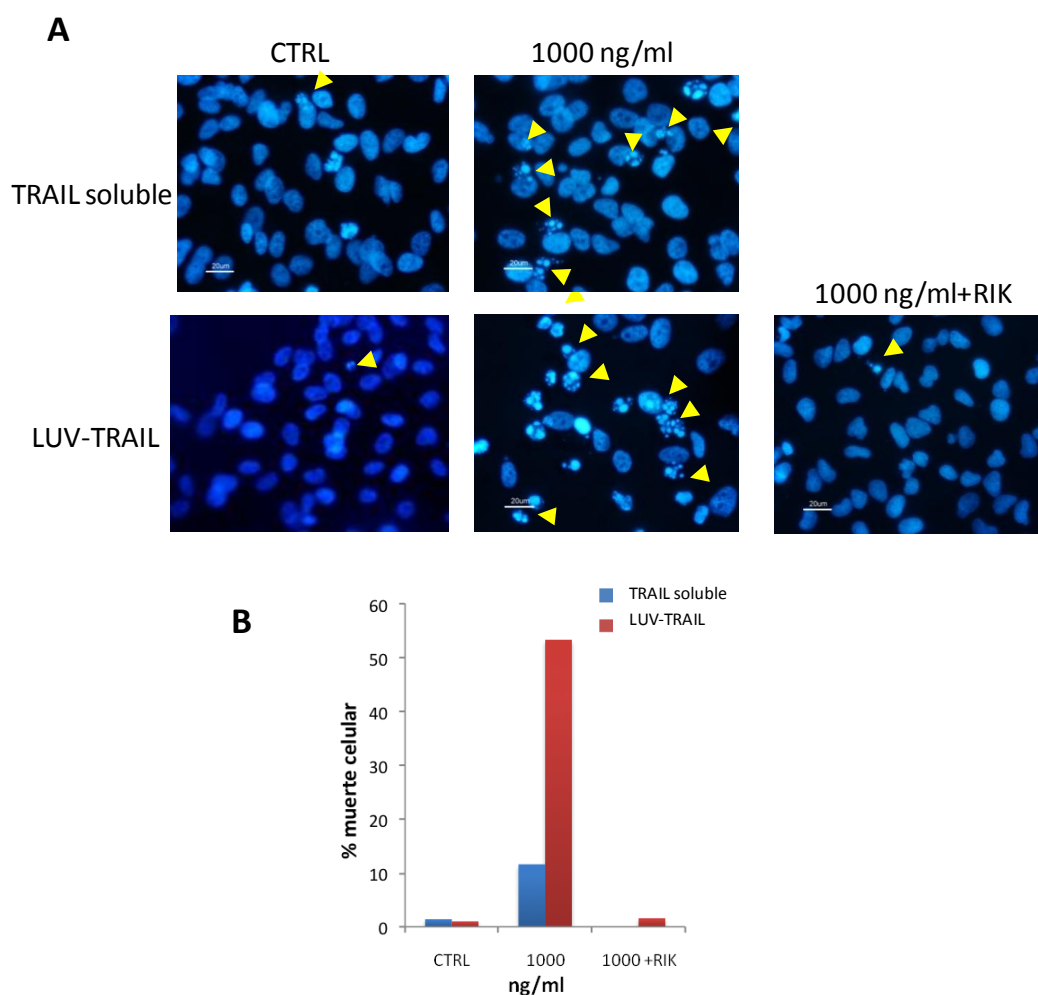


Figura 17: A) Cambios morfológicos nucleares tras el tratamiento con TRAIL soluble y LUV-TRAIL en las células Caki-1. Las células se trataron con las 1000 ng/ml de TRAIL soluble (azul) y de LUV-TRAIL durante 12 horas. Posteriormente las células se tiñeron con Hoechst 33342 y se visualizaron al microscopio de fluorescencia. aumento original 200x. B) En paralelo, se trataron células Caki-1 con las mismas dosis de TRAIL soluble y LUV-TRAIL y tras 12 horas se analizó la muerte celular mediante citometría de flujo tras haber realizado el marcaje con 7-AAD y anexinaV.

7.2.3. Activación de las caspasas tras el tratamiento con los LUV-TRAIL

En las células Caki-1 también se analizó por *Western blot* la activación de las caspasas 8 y 3, principales caspasas implicadas en la vía extrínseca de la apoptosis y la expresión de la proteína pro-apoptótica Bid (figura 18).

Figura 18.

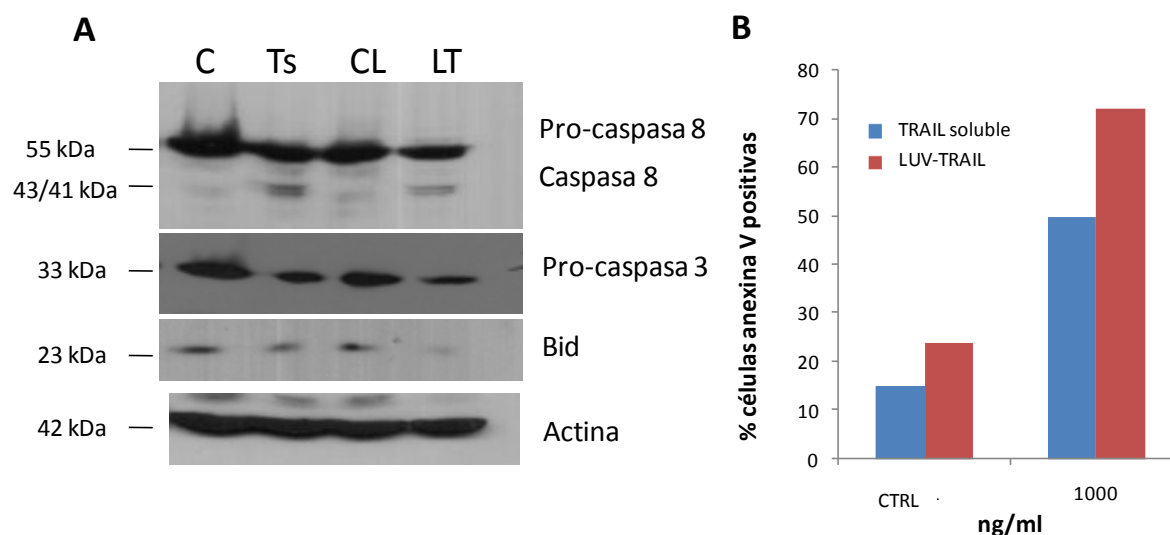


Figura 18: A) Análisis de la expresión de proteínas implicadas en la apoptosis tras el tratamiento con los LUV-TRAIL en las células Caki-1. Las células no se trataron (C) o fueron tratadas con LUVs sin TRAIL acoplado a su superficie (CL), con 1000 ng/ml de TRAIL soluble (Ts) y con 1000 ng/ml de LUV-TRAIL (LT) durante 12 horas, tras lo cual se realizaron los extractos citosólicos en los que las proteínas se separaron mediante electroforesis y se transfirieron a una membrana de PVDF. La expresión de caspasa 8, caspas 3 y Bid se analizó incubada la membrana con anticuerpos específicos. B) Antes de realizar los lisados celulares se tomó una alícuota de cada punto experimental. En paralelo, se trataron células Caki-1 con las mismas dosis de TRAIL soluble y LUV-TRAIL y se analizó la muerte celular por citometría de forma paralela a los lisados mediante marcaje con anexina-V-FITC.

Como se observa en la figura 18 A, el tratamiento de las células Caki-1 con LUV-TRAIL produjo el descenso de las forma pro-activa de caspasa 8 3 así como la generación de la forma procesada de caspasa 8 de una manera similar. Respecto a la caspasa 3 y Bid, LUV-TRAIL produjo un mayor descenso de sus formas pro-activas que TRAIL soluble. El mayor descenso de la pro-caspasa ejecutora 3 y de Bid inducido por los LUV-TRAIL se correlaciona con un mayor porcentaje de muerte celular (figura 18. B).

7.2.4. Inhibición de la citotoxicidad inducida por los LUV-TRAIL con inhibidor de caspasas z-VAD

Para determinar si la muerte celular inducida por los LUV-TRAIL en las células Caki-1 es dependiente de la activación de caspasas, se estudió la capacidad citotóxica de los LUV-TRAIL (figura 19) tras haber pre-incubado las células con el inhibidor general de caspasas (z-VAD) en. Tal y como se observa en la figura 19 la pre-incubación de las células con z-VAD protegió a las células de la acción citotóxica tanto de TRAIL soluble como de los LUV-TRAIL.

Figura 19.

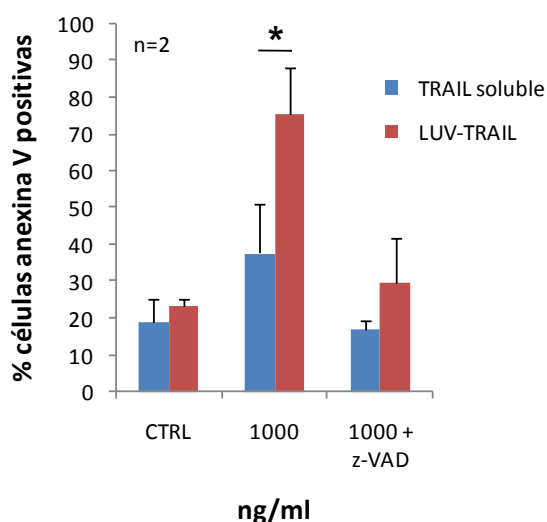


Figura 19: Ensayo de inhibición de la muerte celular en las células Caki-1. Las células fueron tratadas con 1000 ng/ml de TRAIL soluble o LUV-TRAIL tras haberlas pre-incubado o no durante 1 hora con el inhibidor general de caspasas z-VAD. Tras 24 horas se analizó la muerte celular mediante citometría de flujo. La gráfica muestra los niveles de apoptosis observados mediante marcaje con anexina-V-FITC de 2 experimentos independientes. *** $p < 0,001$.

7.3. CULTIVOS 3 DIMENSIONES

7.3.1. Difusión dextrano (\approx TRAIL) y LUVTRAIL-Rho

Antes de emplear TRAIL soluble y LUV-TRAIL en los cultivos celulares 3D se estudió la capacidad de difusión de TRAIL y LUV-TRAIL-Rho para evaluar su capacidad de penetración a través de una matriz de colágeno. Para reproducir la difusión de TRAIL soluble y ante la falta de una formulación fluorescente de TRAIL soluble, se realizó el

ensayo de difusión empleando un dextrano fluorescente con un peso molecular de 70 kDa, similar al trímero de TRAIL.

Figura 20.

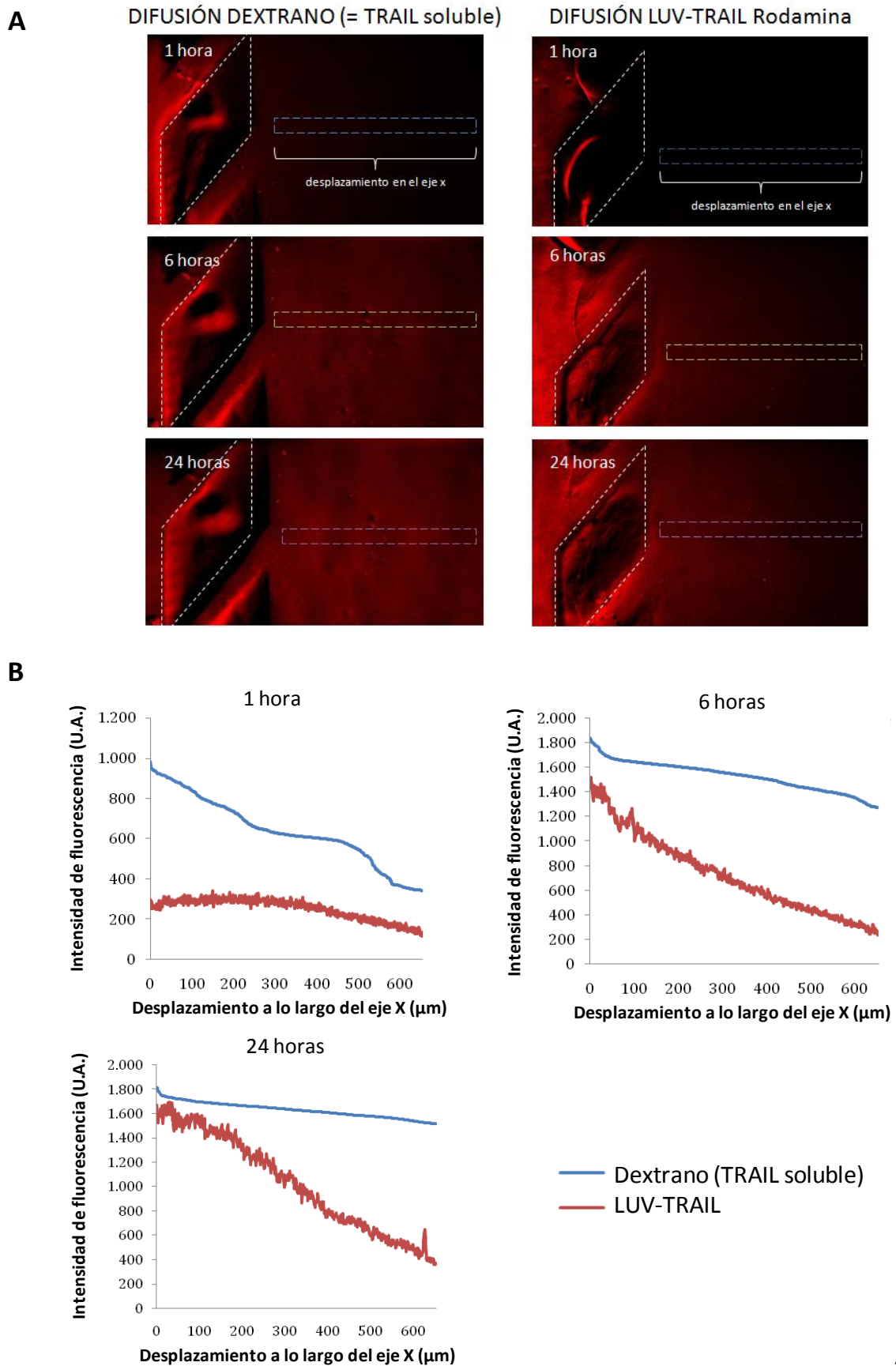


Figura 20: A) fotografías tomadas a distintos tiempos (1 hora, 6 horas, 24 horas) después de introducir el dextrano (\approx TRAIL soluble) ó LUV-TRAIL-Rho. Se observan los pilares del chip (línea discontinua blanca), a la izquierda de éstos el canal lateral en el que se incorpora el dextrano o LUV-TRAIL-Rho y a la derecha de los pilares la cámara central por donde difunden ambas sustancias a través de la matriz de colágeno. El rectángulo en línea discontinua indica la superficie de medida de intensidad de fluorescencia. La longitud de esta superficie son los μm de la cámara central representados en las gráficas para poder representar la difusión. **B)** Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de las imágenes frente a la longitud de la superficie donde se han medido esas intensidades. Se observa la penetración del dextrano (\approx TRAIL soluble, azul) y de LUV-TRAIL (rojo) a los largo del tiempo.

Los chips fueron fotografiados a los tiempos indicados y las imágenes analizadas con el *software FIJI*[®](<http://fiji.sc/Fiji>) (figura 20. A). Se seleccionó una determinada zona y se midió la intensidad de fluorescencia pasadas 1, 6 y 24 horas. La capacidad de difusión de las dos formulaciones de TRAIL se representó gráficamente para poder comparar la difusión de ambas (figura 20. B).

Los LUV-TRAIL poseen un tamaño mayor que TRAIL lo que dificulta su difusión por el hidrogel de colágeno. A las 24 horas los LUV-TRAIL comienzan a llegar al centro del chip y empiezan a aumentar las intensidades a lo largo del eje X pero sin que la difusión sea completa ni siquiera a las 24 horas.

7.3.2. Ensayo citotoxicidad sobre la línea celular A549 en 3D

El desarrollo de plataformas microfluídicas para el mantenimiento de cultivos celulares 3D resultan muy útiles ya que se puede asemejar resultados *in vitro* a las condiciones *in vivo* del microambiente tumoral.

Una vez demostrada la mayor eficacia de LUV-TRAIL en cultivos convencionales, se procedió a realizar un estudio en sistemas tridimensionales usando TRAIL Y LUV-TRAIL. En las diferentes imágenes se puede observar las células vivas coloreadas en verde gracias al uso de la calceína y en rojo las muertas teñidas con IP. Tanto en las imágenes (figura 21) como en su posterior recuento (figura 22), se observa como el porcentaje de mortalidad en los controles es bajos y como aumenta ligeramente al emplear TRAIL soluble, siendo dicho aumento significativamente mayor con el uso de LUV-TRAIL.

Figura 21.

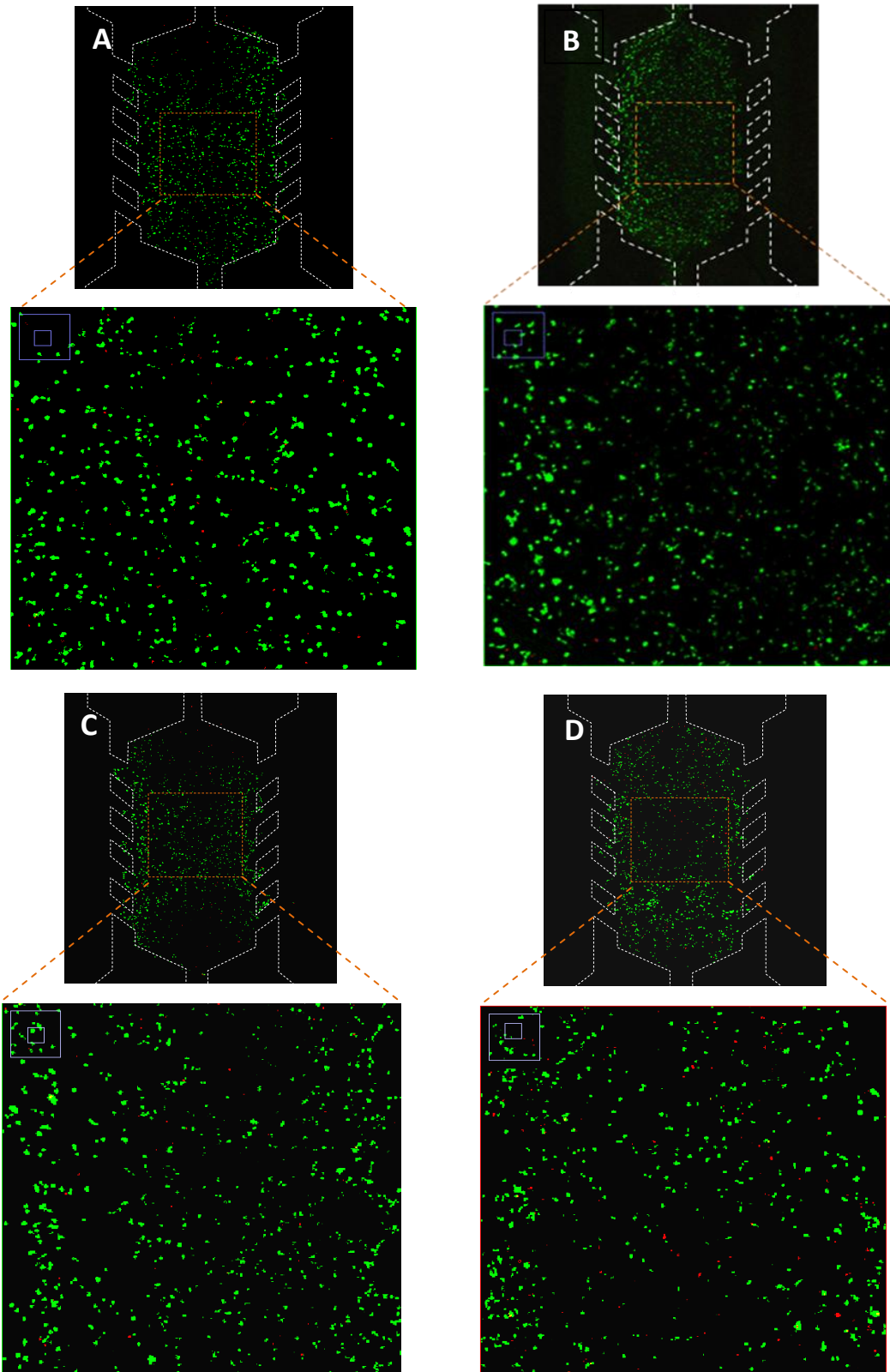


Figura 21: Cultivo 3D de la células A549 tratadas con TRAIL soluble y LUV-TRAIL. Las imágenes superiores muestran el microchip completo y en las inferiores se muestra aumentada la región seleccionada. Se observan en verde las células vivas y en rojo las muertas. A) Control, B) Control LUVs, C) TRAIL soluble 1000 ng/ml, D) LUV-TRAIL 1000 ng/ml.

Figura 22.

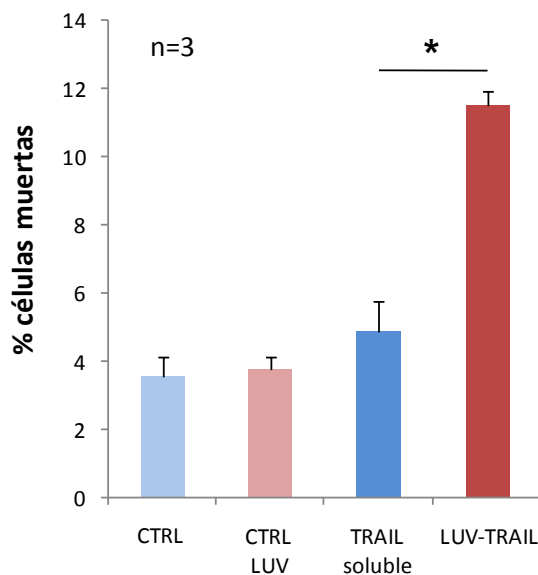


Figura 22: Cuantificación de la muerte celular obtenida en los cultivos 3D de las células A549. En los microchips mostrados en la figura 21 se realizó el conteo de las células vivas (verde en los chips) y células muertas (rojas en el chip). La gráfica representa la media \pm desviación estándar del porcentaje de células muertas respecto al total de células cuantificada. * $p < 0,05$.

Los datos obtenidos en el cultivo de 3D se corresponden con los resultados en experimentos convencionales aunque los datos de mortalidad en los chips son menores que en los ensayos de citotoxicidad realizados en los cultivos convencionales. En la línea A549 no se supera una mortalidad del 12% en el cultivo 3D frente al 35% obtenido en cultivos convencionales.

7.3.3. Ensayo citotoxicidad sobre la línea celular Caki-1 en 3D

Después de comprobar la eficacia tanto de TRAIL soluble como de LUV-TRAIL en cultivos tradicionales, del mismo modo que el ensayo llevado a cabo con las células A549, se analizó la capacidad citotóxica de ambas formulaciones de TRAIL en cultivos 3D realizados en plataformas microfluídicas sobre la línea celular Caki-1 (figura 23).

Los resultados demuestran la alta sensibilidad de Caki-1 a TRAIL y LUV-TRAIL con una mortalidad alrededor del 55% y 65% respectivamente (figura 24). Al igual que en los cultivos convencionales, las células Caki-1 fueron más sensibles a la muerte inducida por los LUV-TRAIL aunque en este caso la diferencia no fue significativa en comparación con TRAIL soluble.

Figura 23.

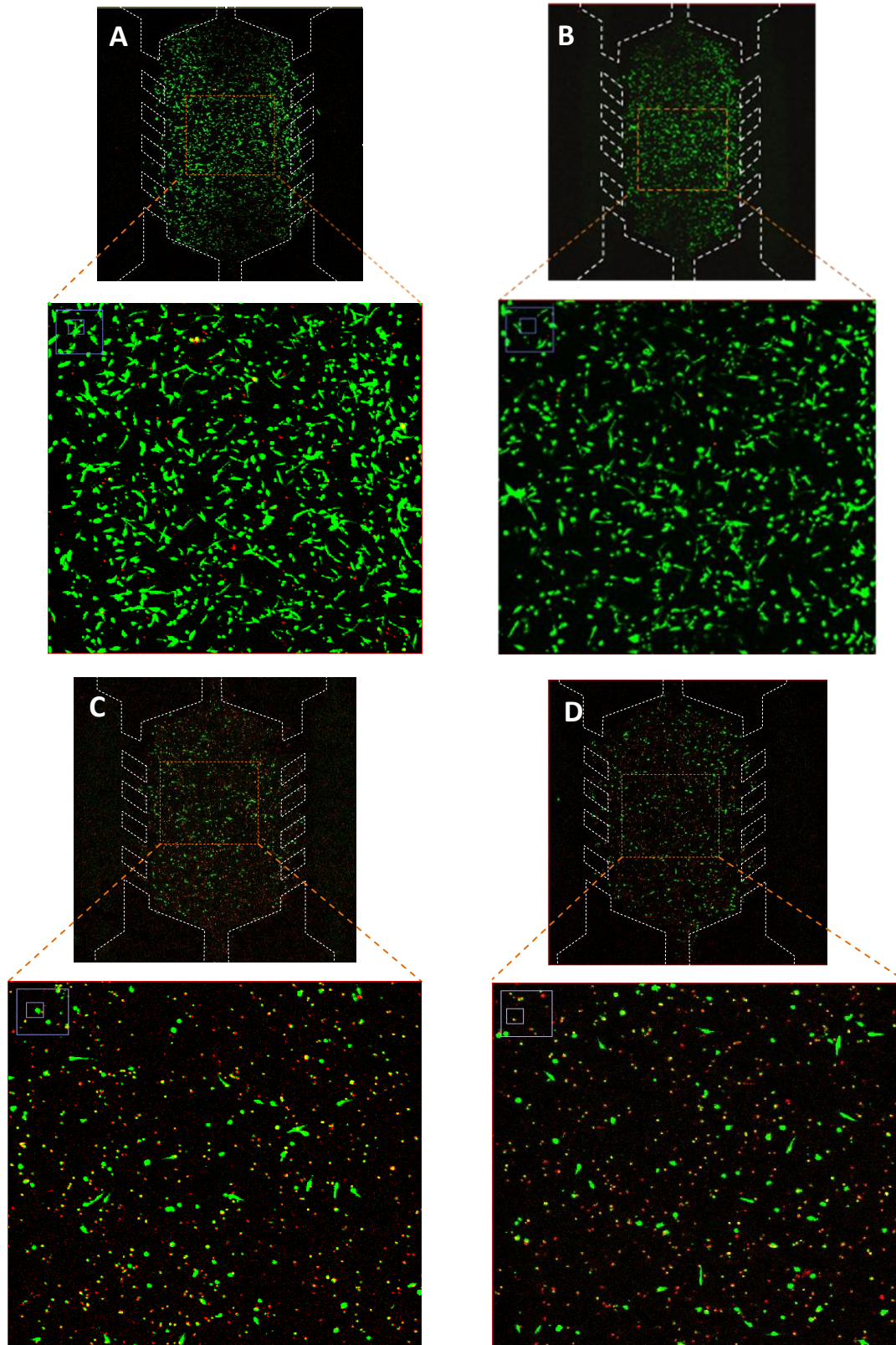


Figura 23: Cultivo 3D de la células Caki-1 tratadas con TRAIL soluble y LUV-TRAIL. Las imágenes superiores muestran el microchip completo y en las inferiores se muestra aumentada la región seleccionada. Se observan en verde las células vivas y en rojo las muertas. A) Control, B) Control LUVs, C) TRAIL soluble 1000 ng/ml, D) LUV-TRAIL 1000 ng/ml.

Figura 24.

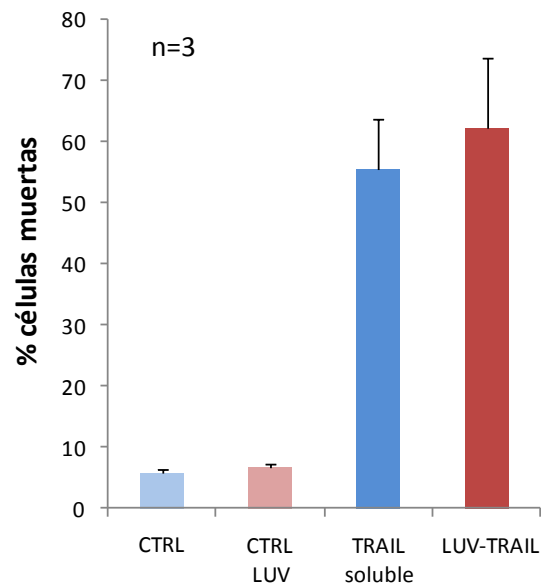


Figura 24: Cuantificación de la muerte celular obtenida en los cultivos 3D de las células Caki-1. En los microchips mostrados en la figura 21 se realizó el conteo de las células vivas (verde en los chips) y células muertas (rojas en el chip) La gráfica representa la media \pm desviación estándar del porcentaje de células muertas respecto al total de células cuantificada. * $p < 0,05$.

8. Discusión

La idea de emular la forma fisiológica de liberación de TRAIL ha dado lugar a la generación de liposomas artificiales de composición lipídica y tamaños similares a los exosomas naturales con la posterior unión de TRAIL bioactivo a su superficie (LUV-TRAIL). Es una nueva formulación para intentar evitar la resistencia a TRAIL por parte de una gran mayoría de tumores.

En el estudio comparativo de la capacidad citotóxica de los LUV-TRAIL frente a la forma soluble de TRAIL (similar a la que se ha empleado en los ensayo clínicos frente a distintos tipos de tumores), en todas las ocasiones los LUV-TRAIL han demostrado un mayor potencial citotóxico. En la línea celular A549, que presenta una resistencia casi completa a TRAIL soluble, la asociación con los liposomas ha supuesto un significativo aumento de la capacidad citotóxica de este ligando mortal tanto en lo que a porcentaje de células apoptóticas y a disminución de proliferación celular se refiere. Además, este aumento de bioactividad no sólo se traduce en un aumento de la citotoxicidad a corto plazo sino también a largo plazo tal y como se observa en la mayor capacidad de los LUV-TRAIL de inhibir la formación de colonias por parte de las células A549. Esto último resulta de interés ya que se puede traducir en futuros ensayos *in vivo* en una capacidad de detener el crecimiento del tumor de una forma más mantenida.

Para constatar que el aumento de citotoxicidad que muestran los LUV-TRAIL sobre las células A549 procede y es específico de TRAIL, se han realizado ensayos de inhibición con el anticuerpo bloqueante de TRAIL. La pre-incubación con RIK lleva la citotoxicidad de LUV-TRAIL a niveles basales controles. En este sentido hay que destacar que en todos los ensayos de citotoxicidad como control de los LUV-TRAIL se empleó LUVs sin su posterior unión a TRAIL. Estos LUVs solos en ningún caso produjeron citotoxicidad *per se*. Todos estos resultados en conjunto demuestran que la capacidad citotóxica de los LUV-TRAIL depende exclusivamente de la presencia de TRAIL en su superficie.

Después de comprobar que la muerte celular causada por los LUV-TRAIL se debe específicamente a TRAIL se decidió profundizar en el mecanismo de muerte que se

estaba produciendo en las células A549. Los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que la muerte producida tanto por TRAIL, tal y como se había descrito previamente, como por los LUV-TRAIL se debe a un proceso de inducción de apoptosis. La muerte inducida por los LUV-TRAIL presenta tres propiedades típicas de este tipo de muerte celular. La primera de ellas es la detección, gracias a la unión específica de la anexina V, de fosfatidil-serina en la cara externa de la membrana plasmática, uno de los signos precoces de la apoptosis. Por otra parte también se estudió la morfología nuclear mediante tinción con el colorante *Hoechst* y se visualizaron los cambios propios producidos en este orgánulo durante la apoptosis. Se pudo detectar los núcleos fragmentados y agrupados formando cuerpos apoptóticos, todos ellos signos inconfundibles del mecanismo de apoptosis. El número de células A549 encontradas con esta morfología después de ser tratadas con LUV-TRAIL también es mayor con respecto al uso de TRAIL soluble. Por último, se analizó otro evento característico de la muerte celular por apoptosis, la activación de las caspasas. Se analizó mediante *Western blot* la activación de la caspasa 8, principal caspasa iniciadora, y la caspasa 3, la principal caspasa ejecutora y de la proteína Bid que enlaza la vía extrínseca con la intrínseca amplificando la señal de los ligandos. El tratamiento de las células A549 con los LUV-TRAIL produjo la disminución del nivel de procaspasas en la línea indicando la formación de caspasas activas. Esto indica que en la muerte celular inducida por TRAIL y LUV-TRAIL intervienen estas proteasas características de la apoptosis. Además gracias a este experimento también se visualizó una mayor disminución del nivel de procaspasas tras el tratamiento con los LUV-TRAIL en comparación con el tratamiento con TRAIL soluble, lo que nos indica que con la nueva formulación de TRAIL se consigue una mayor activación de las caspasas y de ahí que su potencial citotóxico sea mayor. La forma pro-activa de la proteína pro-apoptótica Bid también disminuye su presencia con el uso de TRAIL y LUV-TRAIL pero no se observó una diferencia obvia en la activación de esta proteína tras el tratamiento con las dos formulaciones de TRAIL.

Para confirmar que la activación de las caspasas interviene el mecanismo de muerte inducida por LUV-TRAIL se incubaron las células con el inhibidor general de caspasas z-VAD antes de añadir TRAIL y LUV-TRAIL. El porcentaje de muerte celular en este caso

fue similar a las obtenidas en los controles indicando que la inhibición de las caspasas elimina el potencial citotóxico de los LUV-TRAIL demostrando que su implicación es fundamental en el mecanismo de muerte inducido por éstos.

Con respecto a la células Caki-1, se han llevado a cabo los mismos experimentos que en el caso de las A549. La mayor diferencia entre ambas líneas celulares tumorales, además de su origen, es su sensibilidad a TRAIL, ya que las células Cakil-1 son muy sensibles a TRAIL, su forma soluble induce apoptosis en más del 60% celular. El empleo de los LUV-TRAIL sobre esta línea celular también presentó un mayor potencial citotóxico, sin embargo las diferencias con TRAIL no llegaron a ser significativas. Al igual que en las células A549, la muerte celular es exclusivamente dependiente de TRAIL ya que tanto las células tratadas con liposomas solos como la pre-incubación con RIK disminuyeron la mortalidad a niveles basales. En el ensayo de citotoxicidad a largo plazo tanto TRAIL soluble como los LUV-TRAIL disminuyeron en gran medida la capacidad de formar colonias de las células Caki-1 sin observarse diferencias significativas probablemente debido a la gran sensibilidad que estas células muestran ya a la forma soluble de TRAIL.

Respecto al tipo de muerte inducida por los LUV-TRAIL en las células Caki-1, la traslocación de fosfatidil-serina en la cara externa de la membrana plasmática constatada por la presencia de células anexina V positivas, la morfología nuclear encontrando más del 50% de núcleos fragmentados y condensados tras el tratamiento de LUV-TRAIL y la disminución de las pro-caspasas 8 y 3 indican que también en las células Caki-1 la muerte celular provocada por las LUV-TRAIL es un proceso apoptótico. En el caso de las Caki-1 se produce una disminución mas explicita de Bid con el uso de LUV-TRAIL frente al de TRAIL evento que no se reflejaba en las A549 indicando que quizá en las células Caki-1 la activación de la vía extrínseca de la apoptosis cuando éstas se tratan con los liposomas con TRAIL produce una mayor activación de la vía intrínseca a través del nexo de unión de ambas vías que supone Bid. Por último, también se demostró que el uso de z-VAD disminuye la capacidad citotóxica de LUV-TRAIL con lo que se puede concluir que de nuevo la muerte celular producida por LUV-TRAIL en las células Caki-1 se debe a un mecanismo de apoptosis.

En este estudio además de ver la potencialidad de LUV-TRAIL sobre las líneas celulares A549 y Caki-1 en cultivos celulares tradicionales, se pretendía avanzar un poco más y visualizar el efecto citotóxico de TRAIL y LUV-TRAIL en cultivos 3-D. Estos cultivos se realizan en plataformas microfluídicas y permiten obtener unos resultados en un medio más dinámico y que puede asemejar en mayor medida el ambiente tumoral real. Estas plataformas microfluídicas permiten la evaluación de de diversos parámetros como la difusión de un fármaco o la angiogénesis de los tumores.

En este trabajo se ha estudiado la difusión de TRAIL y LUV-TRAIL y como era de esperar debido a su diferente tamaño, TRAIL soluble difunde rápidamente por la cámara central del microchip mientras que LUV-TRAIL penetra muy despacio y al cabo de 24 horas comienza a llegar al centro de la cámara. A pesar de ello, en los ensayos citotóxicos con los microchips se obtuvieron unos datos acordes a los obtenidos en los cultivos celulares tradicionales. De nuevo comprobamos como los liposomas solos no presentan citotoxicidad y como los LUV-TRAIL tienen mayor potencial citotóxico que la forma soluble de TRAIL tanto en las células A549 como en las Caki-1, aunque en éstas últimas sin llegar a ser significativa probablemente por su ya gran sensibilidad a TRAIL soluble.

Es cierto que en ambas líneas celulares ya sea con el uso de TRAIL o de los LUV-TRAIL el porcentaje de muerte celular es algo menor que en los ensayos tradicionales. Hay que tener en cuenta que las sustancias difunden de forma pasiva por la cámara del chip y que la detección de la muerte se realiza con yoduro de propidio y no con anexina V. Es decir, en los ensayos tridimensionales se está detectando las apoptosis en estadios muy avanzados cuando el yoduro de propidio es capaz de penetrar en el interior de la célula muerta porque ésta ha perdido su integridad de membrana y no en fases tempranas como ocurre con el uso de la anexina V.

Con los resultados obtenidos en este trabajo en los cultivos 3-D, se ha podido constatar también la capacidad citotóxica de TRAIL soluble y LUV-TRAIL y que ésta se correlaciona con la observada en los cultivos celulares tradicionales validando el empleo de plataformas microfluídicas para la valoración de la capacidad citotóxica de drogas anti-tumorales.

Esto abre las puertas al empleo más amplio de este tipo de plataformas microfluídicas para el estudio de distintas propiedades de las drogas anti-tumorales. El futuro diseño de nuevos microchips con distintas características y configuraciones puede permitir el estudio en mayor profundidad de características de interés en el mecanismo de acción de las drogas anti-tumorales como su capacidad citotóxica selectiva realizando co-cultivos tridimensionales de células tumorales y células normales, la capacidad de difusión activa a través de cultivos en lo que se generen estructuras celulares que asemejen los capilares sanguíneos, o la cinética de penetración al interior tumoral entre otras propiedades.

En definitiva, el empleo de plataformas microfluídicas en las que se pueden imitar de una manera más fisiológica el ambiente tumoral *in vivo* puede ser de gran interés para profundizar en el conocimiento de distintas propiedades que intervienen en el mecanismo de acción de las drogas anti-tumorales, propiedades que no pueden ser analizadas convenientemente en cultivos celulares convencionales y que pueden ser de gran relevancia en la futura aplicación terapéutica de dichas drogas.

9. Conclusiones

Las conclusiones obtenidas en el presente trabajo son:

1. Se han obtenido con éxito liposomas artificiales de composición y tamaño similares a los exosomas naturales con TRAIL anclado a su superficie (LUV-TRAIL) en los que se mantiene la bioactividad de este ligando mortal.
2. Los LUV-TRAIL presentan una mayor capacidad citotóxica que TRAIL soluble en las líneas celulares tumorales A549 y Caki-1 tanto a corto como a largo plazo en cultivos celulares convencionales.
3. La citotoxicidad inducida por los LUV-TRAIL depende exclusivamente de TRAIL y esta mediada por un mecanismo de apoptosis dependiente de caspasas.
4. TRAIL soluble difunde más rápidamente que los LUV-TRAIL a través de la matriz presente en la cámara central de la plataforma microfluídica.
5. La citotoxicidad de TRAIL soluble y LUV-TRAIL observada en los cultivos celulares tridimensionales correlaciona con la observada en los cultivos celulares tradicionales validando el empleo de plataformas microfluídicas para la valoración de estas drogas anti-tumorales.

Conclusions:

The conclusions obtained in this work are:

1. *It has been successfully obtained artificial liposomes with size and composition similar to natural exosomes with TRAIL anchored on their surface (LUV-TRAIL) in which the bioactivity of this death ligand is preserved.*
2. *LUV-TRAIL show greater cytotoxic ability than soluble TRAIL on A549 and Caki-1 tumor cell lines both short- and long-term in conventional cell cultures.*
3. *Cytotoxicity induced by LUV-TRAIL is exclusive TRAIL-dependent and is mediated by a caspase-dependent apoptotic mechanism.*
4. *Soluble TRAIL diffuses faster than LUV-TRAIL through the matrix embedded in the central chamber of the microfluidic platform.*
5. *Soluble TRAIL and LUV-TRAIL cytotoxicity observed in 3D cell cultures correlates with that observed in conventional cell cultures validating the use of microfluidic platforms for assessing these anti-tumors drugs.*

10. Bibliografía

1. Ashkenazi, A. & Salvesen, G. Regulated cell death: signaling and mechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 337–56 (2014).
2. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495–516 (2007).
3. Gonzalez, F. & Ashkenazi, A. New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene* **29**, 4752–65 (2010).
4. Zhang, L. & Fang, B. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther.* **12**, 228–37 (2005).
5. Salvesen, G. S. & Ashkenazi, A. Snapshot: caspases. *Cell Res* **147**, 476–476 (2011).
6. Boatright, K. M. & Salvesen, G. S. Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 725–731 (2003).
7. Shi, Y. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Mol. Cell* **9**, 459–470 (2002).
8. Bratton, S. B., MacFarlane, M., Cain, K. & Cohen, G. M. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp. Cell Res.* **256**, 27–33 (2000).
9. Lu, M. *et al.* Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis. *Science.* **345**, 98–101 (2014).
10. Nair, P., Lu, M., Petersen, S. & Ashkenazi, A. Apoptosis initiation through the cell-extrinsic pathway. *Methods Enzymol.* **544**, 99–128 (2014).
11. De Miguel, D. *et al.* Liposomes Decorated with Apo2L/TRAIL Overcome Chemoresistance of Human Hematologic Tumor Cells. *Mol. Pharm.* **10**, 893–904 (2013).
12. Yin, X. Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family protein, connects the death receptor and mitochondrial apoptosis pathways. *Cell Res* 161–167 (2000).
13. Walczak, H. E. *et al.* Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med.* **5**, 157–163 (1999).
14. Holland, P. M. Death receptor agonist therapies for cancer, which is the right TRAIL? *Cytokine Growth Factor Rev.* **25**, 185–193 (2014).

15. Cha, S., Kim, M., Choi, Y. H. & Sung, B. 2.8 Å Resolution Crystal Structure of Human TRAIL, a Cytokine with Selective Antitumor Activity. *Immunity* **11**, 253–261 (1999).
16. Hymowitz, S. G. *et al.* Triggering Cell Death : The Crystal Structure of Apo2L / TRAIL in a Complex with Death Receptor 5. *Mol. Cell* **4**, 563–571 (1999).
17. Hymowitz, S. G. *et al.* A Unique Zinc-Binding Site Revealed by a High-Resolution X-ray Structure of Homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry* **4**, 633–640 (2000).
18. Bremer, E. Targeting of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily for Cancer Immunotherapy. *ISRN Oncol.* **2013**, (2013).
19. Lemke, J., von Karstedt, S., Zinngrebe, J. & Walczak, H. Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell Death Differ.* **21**, 1350–64 (2014).
20. Martinez-Lostao, L., Marzo, I., Anel, A. & Naval, J. Targeting the Apo2L/TRAIL system for the therapy of autoimmune diseases and cancer. *Biochem. Pharmacol.* **83**, 1475–83 (2012).
21. Ashkenazi, A. & Herbst, R. S. To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *J. Clin. Invest.* **118**, 1979–1990 (2008).
22. Tur, V. *et al.* DR4-selective tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) variants obtained by structure-based design. *J. Biol. Chem.* **283**, 20560–8 (2008).
23. Bernardi, S., Secchiero, P. & Zauli, G. State of Art and Recent Developments of Anti-Cancer Strategies Based on. *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* **7**, 207–217 (2012).
24. Wajant, H. *et al.* Engineering death receptor ligands for cancer therapy. *Cancer Lett.* **332**, 163–174 (2013).
25. De Miguel, D., Gallego-Lleyda, A., Anel, A. & Martinez-Lostao, L. Liposome-bound TRAIL induces superior DR5 clustering and enhanced DISC recruitment in histiocytic lymphoma U937 cells. *Leuk. Res.* **39**, 657–666 (2015).
26. De Miguel, D. *et al.* Immunotherapy with liposome-bound TRAIL overcomes partial protection to soluble TRAIL-induced apoptosis offered by down-regulation of Bim in leukemic cells. *Clin. Transl. Oncol.* **17**, 657–667 (2015).
27. Martínez-Lorenzo, M. *et al.* Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *J Immunol* **163**, 1274–1281 (1999).

28. Monleón, I. *et al.* Differential Secretion of Fas Ligand- or APO2 Ligand/TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Carrying Microvesicles During Activation-Induced Death of Human T Cells1. *J. Immunol.* **167**, 6736–6744 (2001).
29. Pagano, G. *et al.* Optimizing design and fabrication of microfluidic devices for cell cultures: An effective approach to control cell microenvironment in three dimensions. *Biomicrofluidics* **8**, 046503 (2014).
30. Van Duinen, V., Trietsch, S. J., Joore, J., Vulto, P. & Hankemeier, T. Microfluidic 3D cell culture: from tools to tissue models. *Curr. Opin. Biotechnol.* **35**, 118–126 (2015).
31. Sackmann, E. K., Fulton, A. L. & Beebe, D. J. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature* **507**, 181–9 (2014).
32. Barata, D. Blitterswijk, CV. Habibovic, P. High-throughput screening approaches and combinatorial development of biomaterials using microfluidics. *Acta Biomater* **15**, 756–797 (2015).
33. Martinez-Lostao, L. *et al.* Liposome-bound APO2L/TRAIL is an effective treatment in a rabbit model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **62**, 2272–82 (2010).
34. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55–63 (1983).