

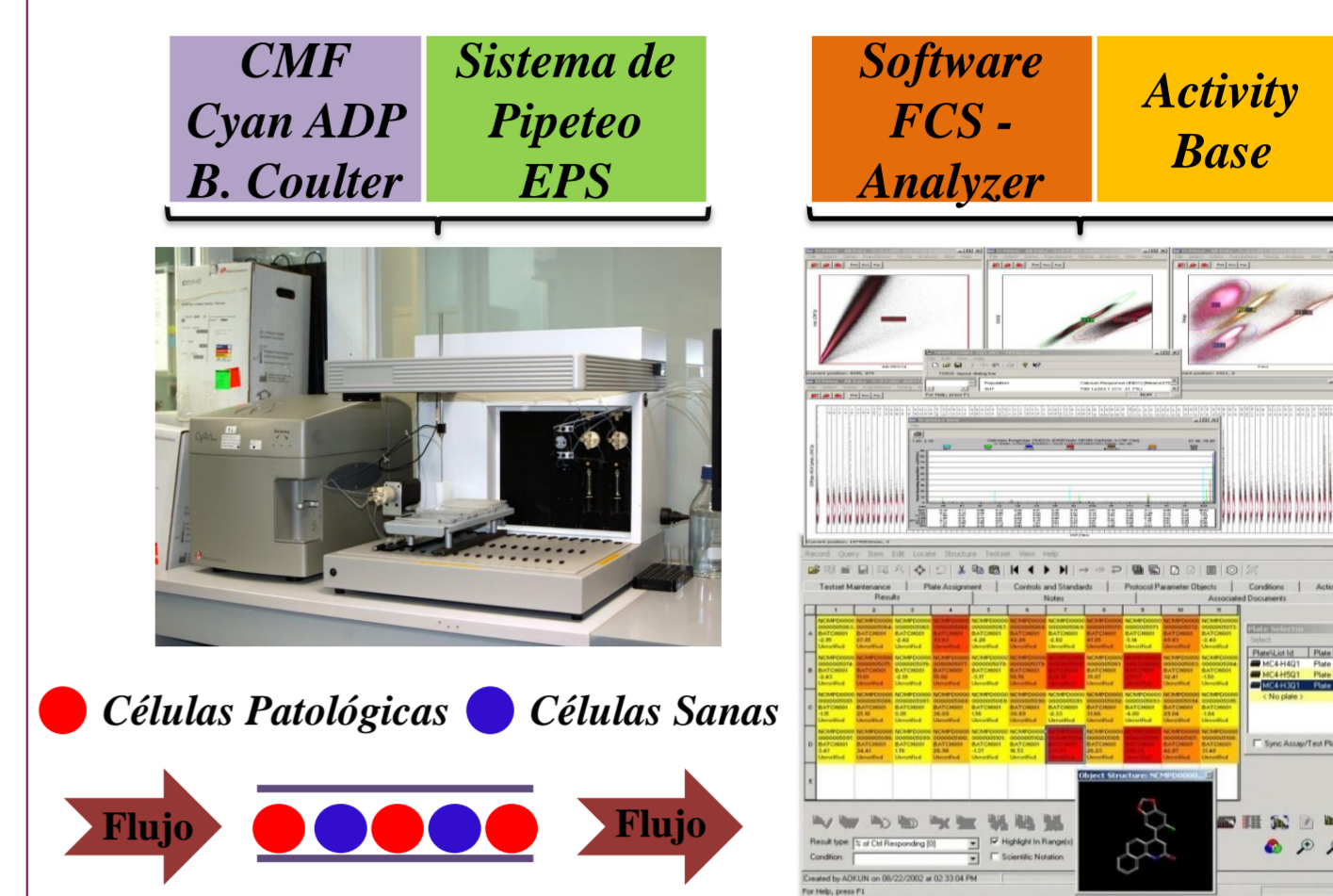
INTRODUCCIÓN

Bosanquet y col. (Br. J. Haematol,1999;106.71-77) diseñaron un test de respuesta tumoral a compuestos antineoplásicos (TRAC) demostrando que la capacidad de los fármacos citotóxicos para inducir apoptosis en células patológicas de leucemia linfática crónica (LLC), puede ser testada ex-vivo. Así, el laboratorio de Vivia Biotech ha diseñado una plataforma de alto rendimiento llamada Exvitech® (Ex-vivo Technology) que permite la detección rápida de apoptosis en muestras biológicas, como médula ósea o sangre periférica, una vez expuestas al efecto de diferentes fármacos o combinaciones. Este sistema permite evaluar mediante citometría de flujo (CMF) y en un corto periodo de tiempo una gran cantidad de datos.

El objetivo de nuestro estudio fue validar la capacidad predictiva del test, comparando nuestros resultados con los obtenidos mediante el test TRAC en muestras de pacientes con leucemia linfática crónica (LLC).

Figura 2

Plataforma ExviTech®



Test TRAC

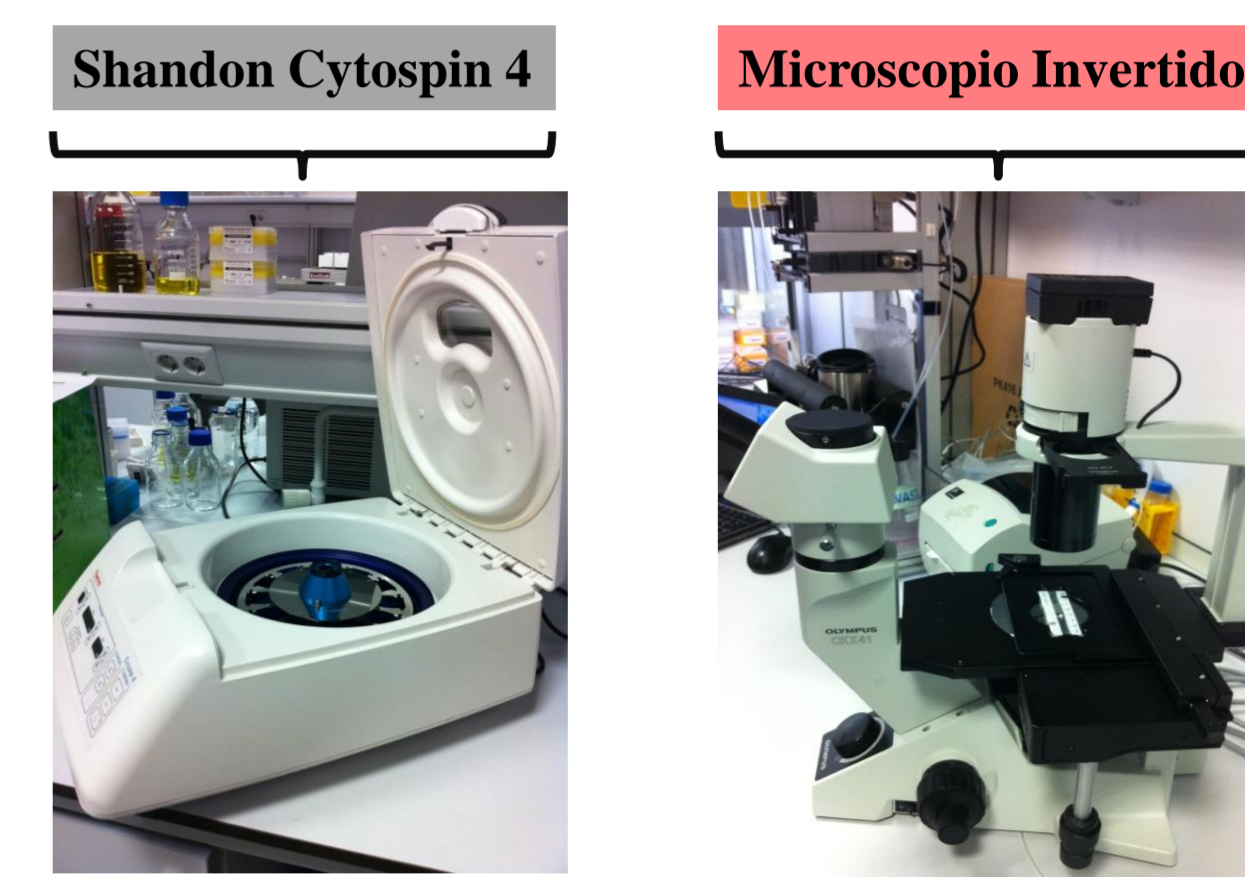


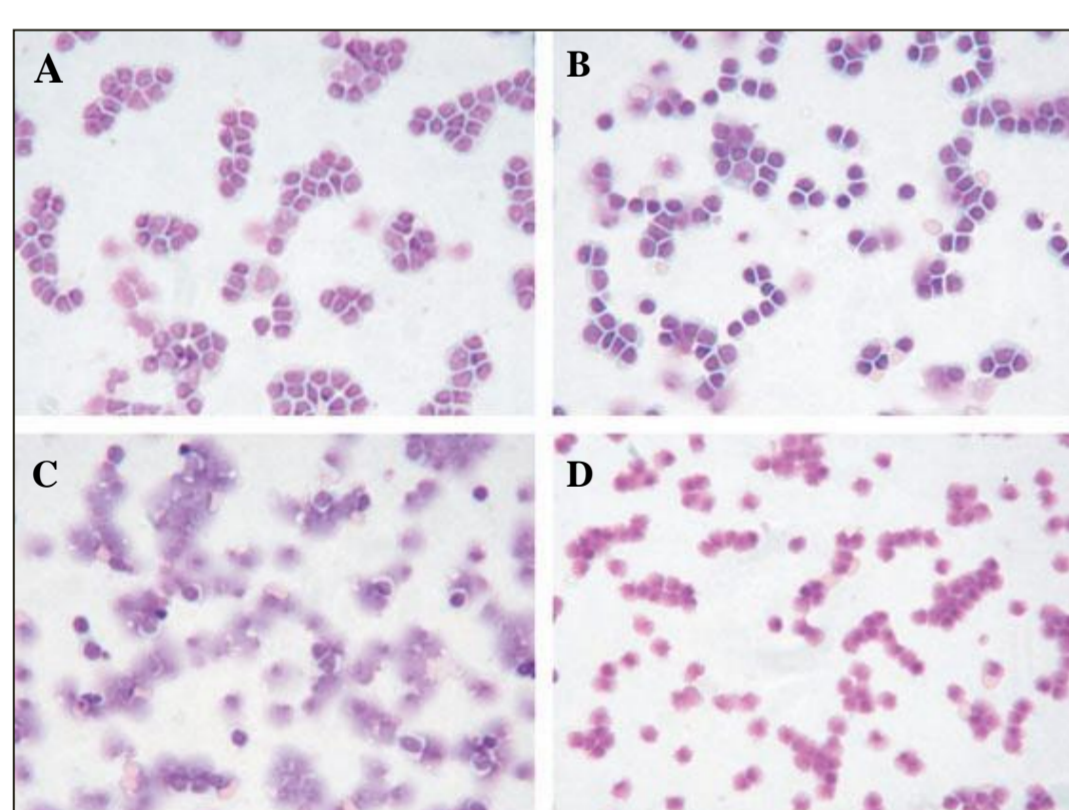
Figura 1. Muestra el diseño de la placa de ensayo utilizada en el test, usando un patrón dosis-respuesta de cinco puntos para cada fármaco.

| | | | | | | | | | | | | |
|---|--------------------------------|---------------------|-------------------------------|---|---|---|-------|---------------|---|----|---|--------------------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | L | 12 |
| A | CONTROL NEGATIVO - DIMSO 0.34% | 100µM | CLORAMBUCILO | | | | 3µM | FLUDARABINA | | | | CONTROL POSITIVO - STAUROSPORIN 50µM |
| B | | 100µM | MAFOSFAMIDA | | | | 2µM | DOXORRUBICINA | | | | |
| C | | 3µM | VINCISTINA | | | | 300µM | PREDNISOLONA | | | | |
| D | | 3µM | MITOXANTRONA | | | | 3µM | CLADRIBINA | | | | |
| E | | 300µM constant 50µM | PENTOSTATINA+2-deoxiadenosina | | | | 30µM | MELFALAN | | | | |
| F | | 300µM | ME-PREDNISOLONA | | | | 300µM | BENDAMUSTINA | | | | |
| G | | 300µM | DEXAMETHASONA | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en 32 muestras congeladas de linfocitos aislados a partir de sangre periférica de pacientes con diagnóstico LLC. Estas células fueron incubadas en placas de 96 pocillos a una concentración de 10⁵ células/pocillo con 13 fármacos citotóxicos utilizados en clínica para el tratamiento de esta enfermedad, usando un patrón dosis-respuesta de cinco puntos para cada fármaco (Figura 1). Tras una incubación de 48h a 37°C y 5% de CO₂ parte de las células fueron procesadas siguiendo el protocolo del test TRAC. Este test consiste en la preparación de portaobjetos altamente concentrados mediante el uso de una centrífuga cytospin, la cual deposita directamente una fina capa de células en un área circular sobre dichos portaobjetos a partir de su suspensión en una mezcla de medio y fármaco. Posteriormente se tiñen con Hematoxilina-Eosina y se analiza el porcentaje de apoptosis con el microscopio invertido (Figura 2). Sobre el resto de las células de la placa, se realizó un marcaje con Anexina V FITC/ CD19 PE / CD45 APC para su posterior adquisición en la plataforma tecnológica Exvitech® (Figura 2), la cual consta de un citómetro de flujo Cyan ADP acoplado a un sistema de pipeteo para formato de 96 pocillos. Los datos de apoptosis fueron analizados con el Software FCS-Analyzer y posteriormente procesados con nuestra base de datos Activity Base.

RESULTADOS



Br J Haematol,2009;146:384-395

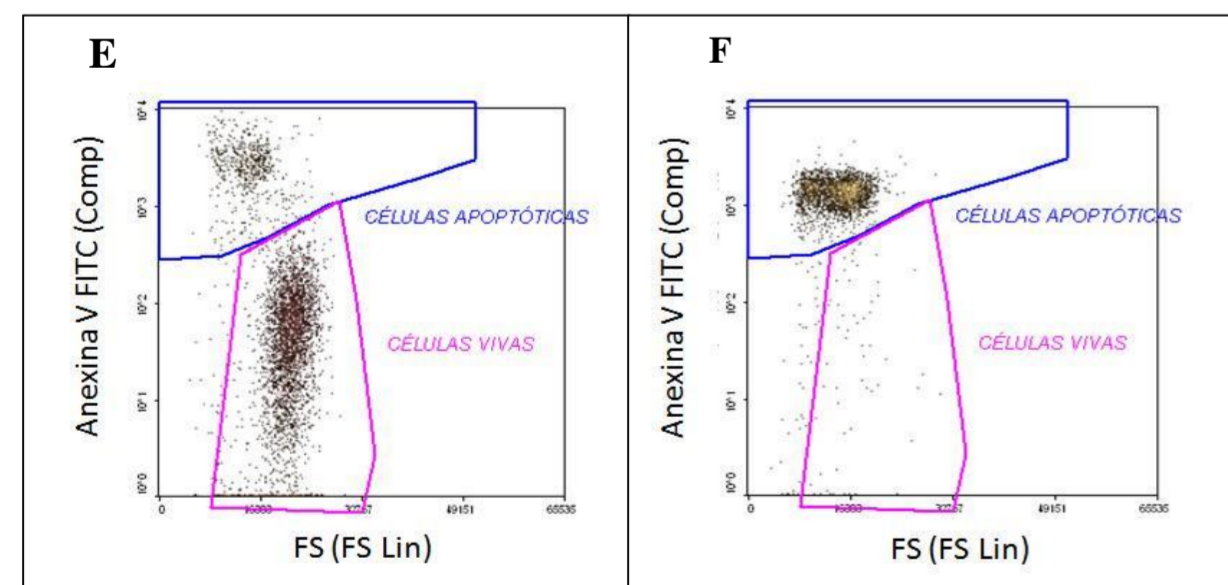


Figura 3. Imágenes de los resultados del ensayo ex-vivo realizado con el test TRAC (A-D) y mediante CMF (E-F). A, B y E muestran la apoptosis de los linfocitos en los pocillos control y C, D y F, tras la incubación con fármacos citotóxicos.

Figura 5. En el gráfico se muestra la correlación existente entre el porcentaje de apoptosis detectado mediante la plataforma Exvitech® y el test TRAC. Considerando globalmente los resultados obtenidos con cada uno de los métodos, se observa una fuerte correlación entre la respuesta detectada por ambos (R=0.8835).

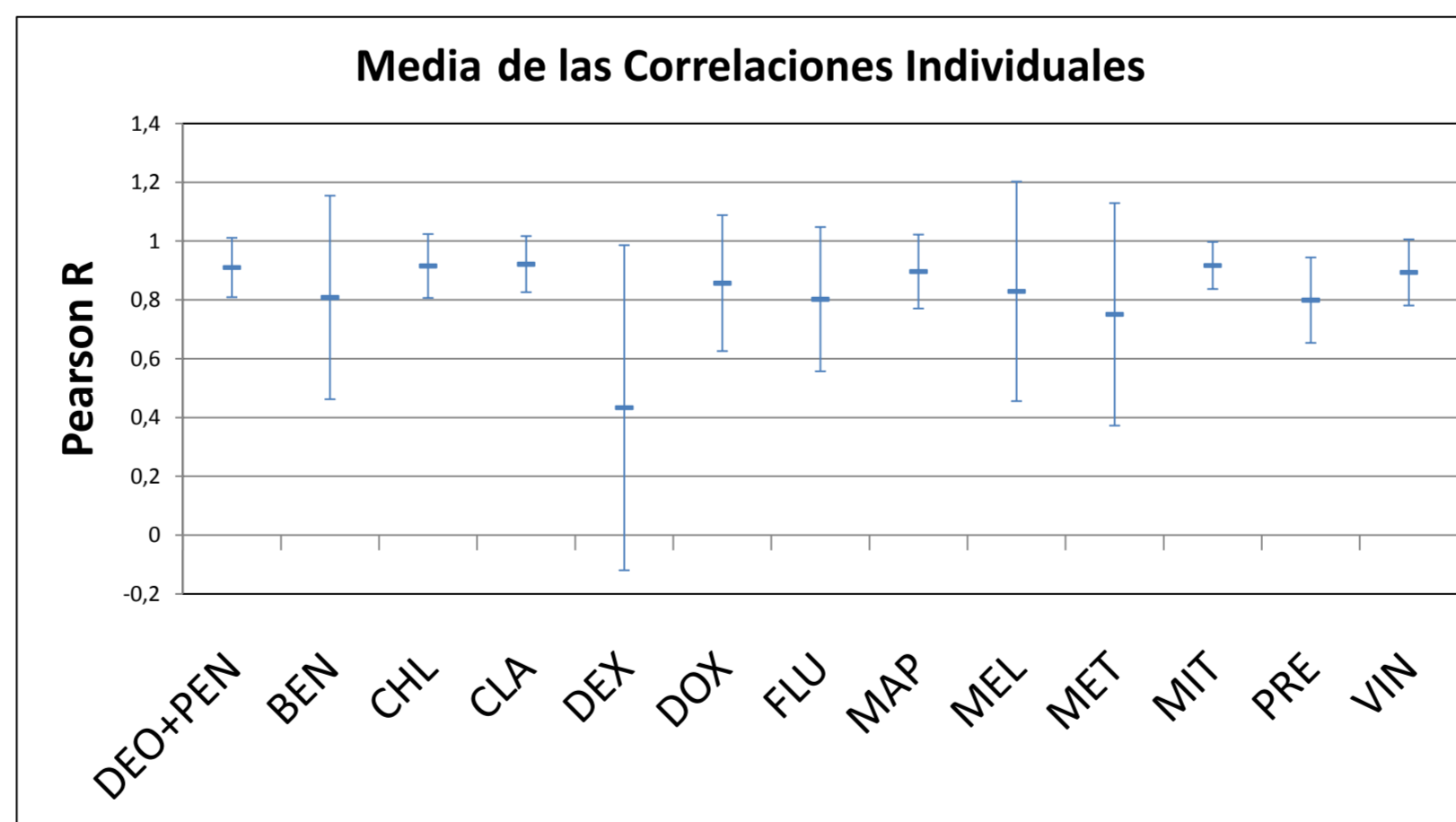
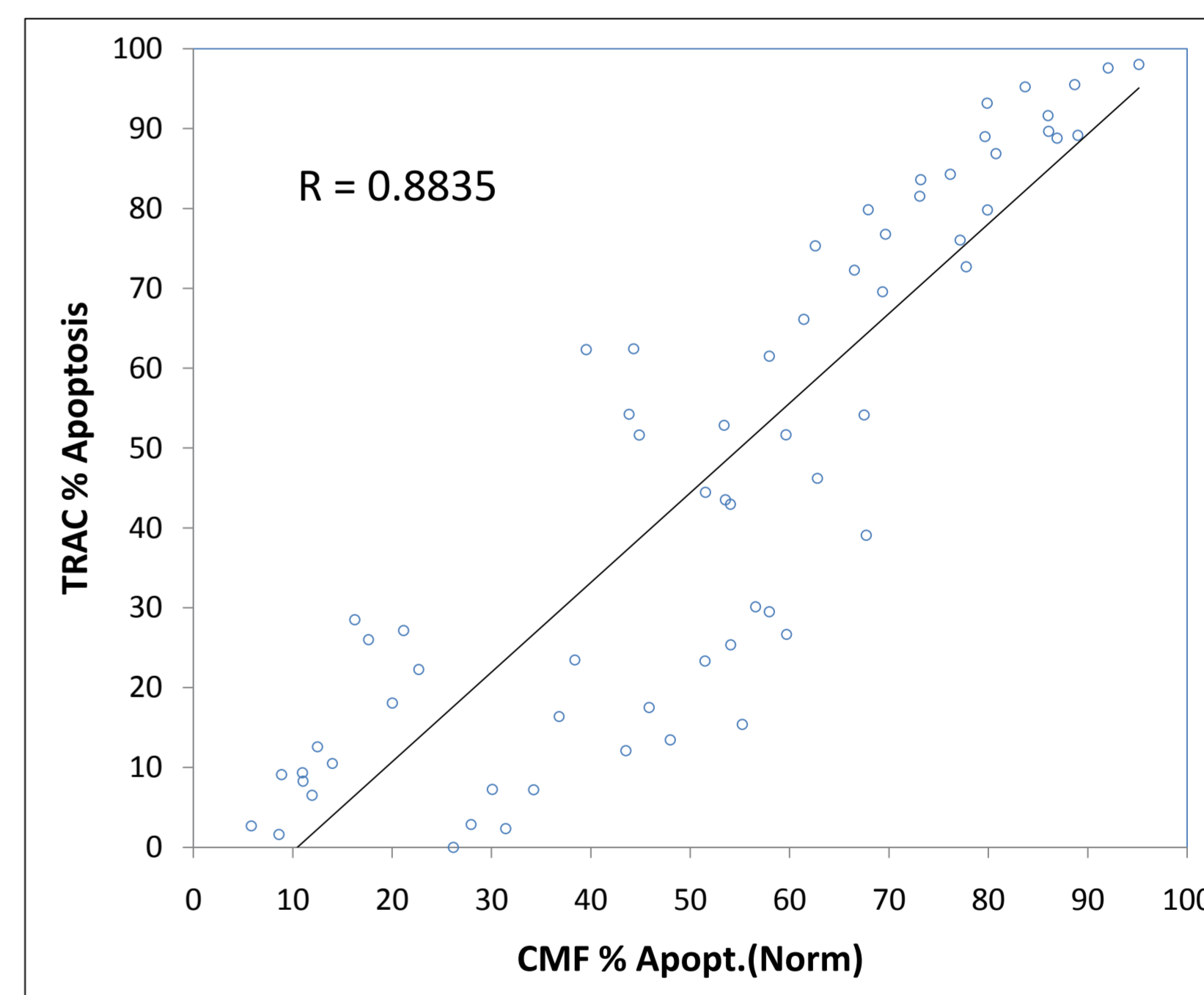


Figura 6. Representación gráfica de la correlación entre los dos métodos de ensayo obtenida para cada fármaco de forma individual. Se observa, que de los trece fármacos estudiados once presentan una buena correlación con un coeficiente $R \geq 0.88$, siendo mayor para aquellos fármacos que resultaron más citotóxicos en el ensayo.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran que la capacidad predictiva del test ex-vivo realizado mediante la plataforma tecnológica Exvitech®, es equivalente a la del test TRAC previamente validado.

Agradecimientos

*Gracias al Biobanco de LLC de la Universidad de Liverpool y a los pacientes, por facilitarnos las muestras incluidas en este estudio y especialmente al Dr. Andrew Bosanquet por enseñarnos la técnica y análisis del Test TRAC.

Trabajo financiado por:
Parques Andalucía 2007 (PCT-090100-2007-33), MICINN
Parques Salamanca 2009 (PPT-010000-2009-12), MICINN
ADE Nuevas Indicaciones de Fármacos 2008
(04/07/SA/0047) Programa Torres Quevedo, MICINN