

# ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN TESTS DE MEDICINA PERSONALIZADA REALIZADOS EN MUESTRA FRESCA DE SANGRE PERIFÉRICA VS CONGELADA.

Sánchez J<sup>1</sup>, Hernández-Campo PM<sup>1</sup>, García V<sup>1</sup>, Bosanquet A<sup>1</sup>, Pettitt A<sup>2</sup>, Primo D<sup>1</sup>, Robles A<sup>1</sup>, Gorrochategui J<sup>1</sup>, Jackson WC<sup>1</sup>, Ballesteros J<sup>1</sup>, Bennett T<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Vivia Biotech, España; <sup>2</sup>Department of Haematology, University of Liverpool, Liverpool, UK.

## INTRODUCCIÓN

La capacidad de los fármacos citotóxicos para inducir apoptosis en células patológicas de leucemia linfática crónica (LLC), puede ser testada ex-vivo. Con este objetivo, Vivia Biotech ha diseñado la plataforma de alto rendimiento Exvitech® (*Ex-vivo Technology*), que permite analizar mediante citometría de flujo, el efecto de miles de fármacos y sus combinaciones en una muestra biológica. Con el fin de comprobar si el tipo de muestra utilizado afectaba de alguna manera al efecto citotóxico observado para dichos fármacos, nos planteamos como objetivo del presente trabajo analizar la respuesta observada en linfocitos aislados a partir de una muestra fresca de sangre periférica (SP) y en linfocitos aislados, congelados a partir de la misma.

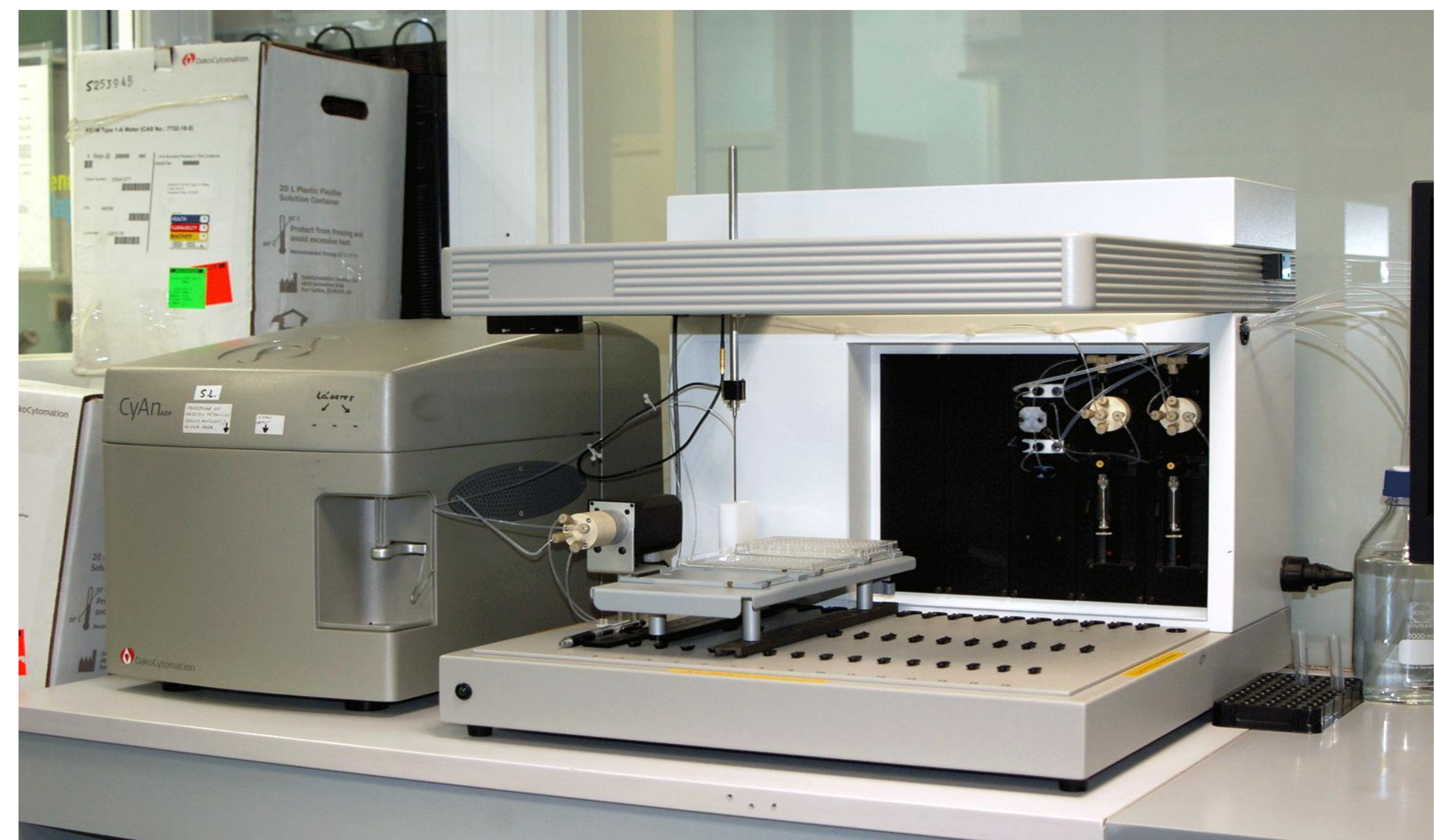
## MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 8 muestras de SP de pacientes con diagnóstico de LLC, a partir de las cuales se aislaron las células mononucleadas utilizando un método de separación por gradiente de densidad (Accuspin™ System-Histopaque®-1077). Parte de estas células fueron congeladas y mantenidas en nitrógeno líquido mientras que el resto se sembraron en una placa de 96 pocillos, a una concentración de 10<sup>5</sup> células/pocillo. Dicha placa, contenía un total de 13 fármacos utilizados en clínica para el tratamiento de esta enfermedad y cada uno de ellos fue testado a 5 concentraciones diferentes (Figura 1). Los controles negativos y positivos, también fueron incluidos en el ensayo. Las placas se incubaron durante 48h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se realizó un marcaje con Anexina V-FITC/CD19-PE/CD45-APC. La adquisición de la muestra se realizó utilizando la plataforma ExviTech® (Figura 2), consistente en un citómetro de flujo Cyan ADP ensamblado a un sistema robotizado de inyección de muestra. Los datos fueron analizados mediante el software FCS-Analyzer y los resultados de apoptosis, procesados mediante nuestra base de datos Activity Base. Transcurridas dos semanas, los linfocitos previamente congelados del mismo paciente, fueron descongelados y procesados de igual modo.

Figura 1. Diseño de la placa de ensayo utilizada en el test. Cinco concentraciones diferentes fueron ensayadas para cada uno de los fármacos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CONTROL NEGATIVO	CLORAMBUCILO					FLUDARABINA					CONTROL POSITIVO
B		MAFOSFAMIDA					DOXORRUBICINA					
C		VINCRISTINA					PREDNISOLONA					
D		MITOXANTRONA					CLADRIBINA					
E		PENTOSTATINA + 2deoxiadenosina					MELFALAN					
F		ME-PREDNISOLONA					BENDAMUSTINA					
G		DEXAMETASONA										
H												

Figura 2. Plataforma ExviTech®



## RESULTADOS

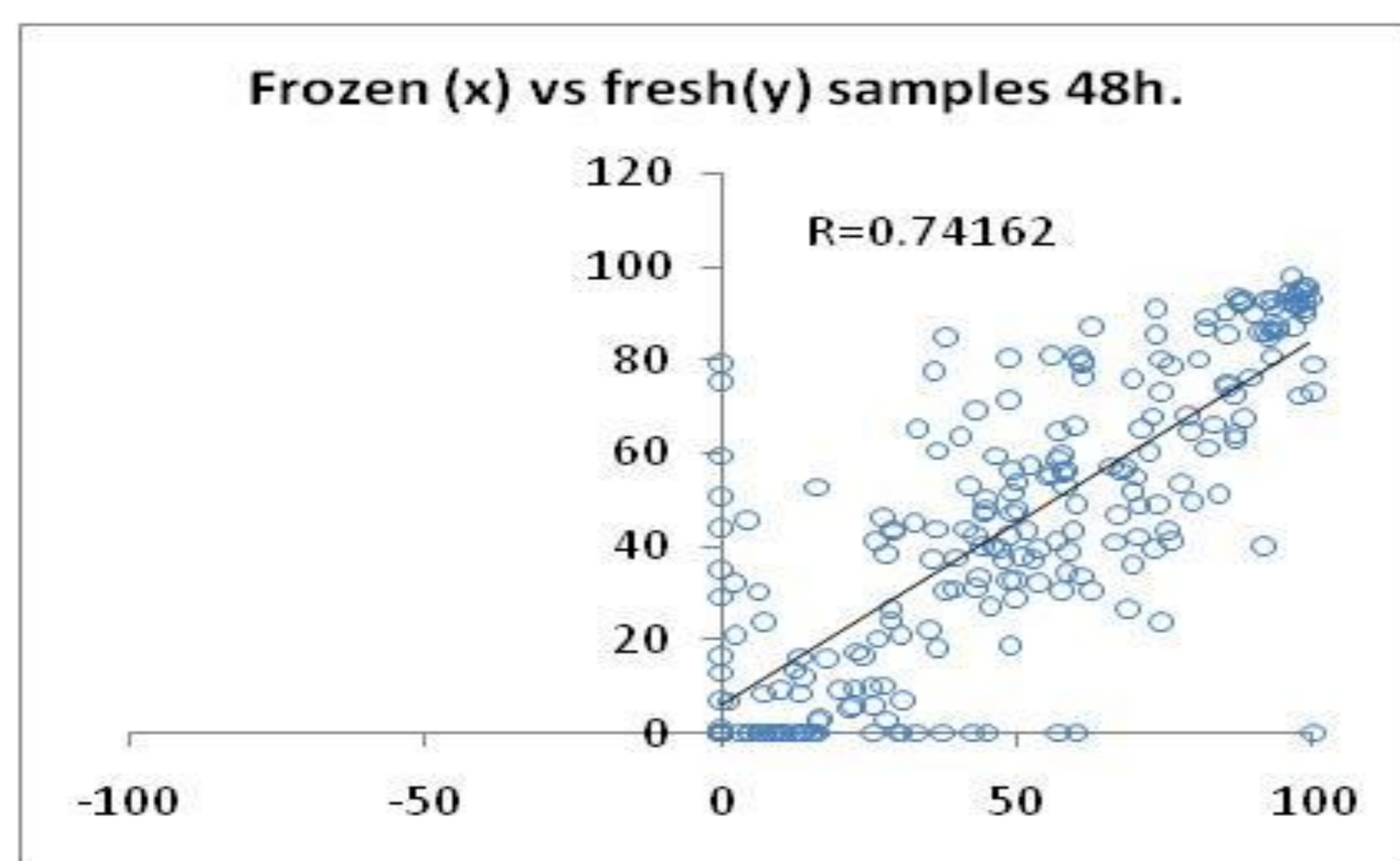


Figure 3. Representación gráfica de la correlación existente entre la apoptosis observada en linfocitos recién aislados a partir de muestra fresca y los previamente congelados, para cada una de las muestras y compuestos ensayados. Considerando los resultados globalmente, existe una fuerte correlación entre la respuesta obtenida en ambos tipos de muestra.

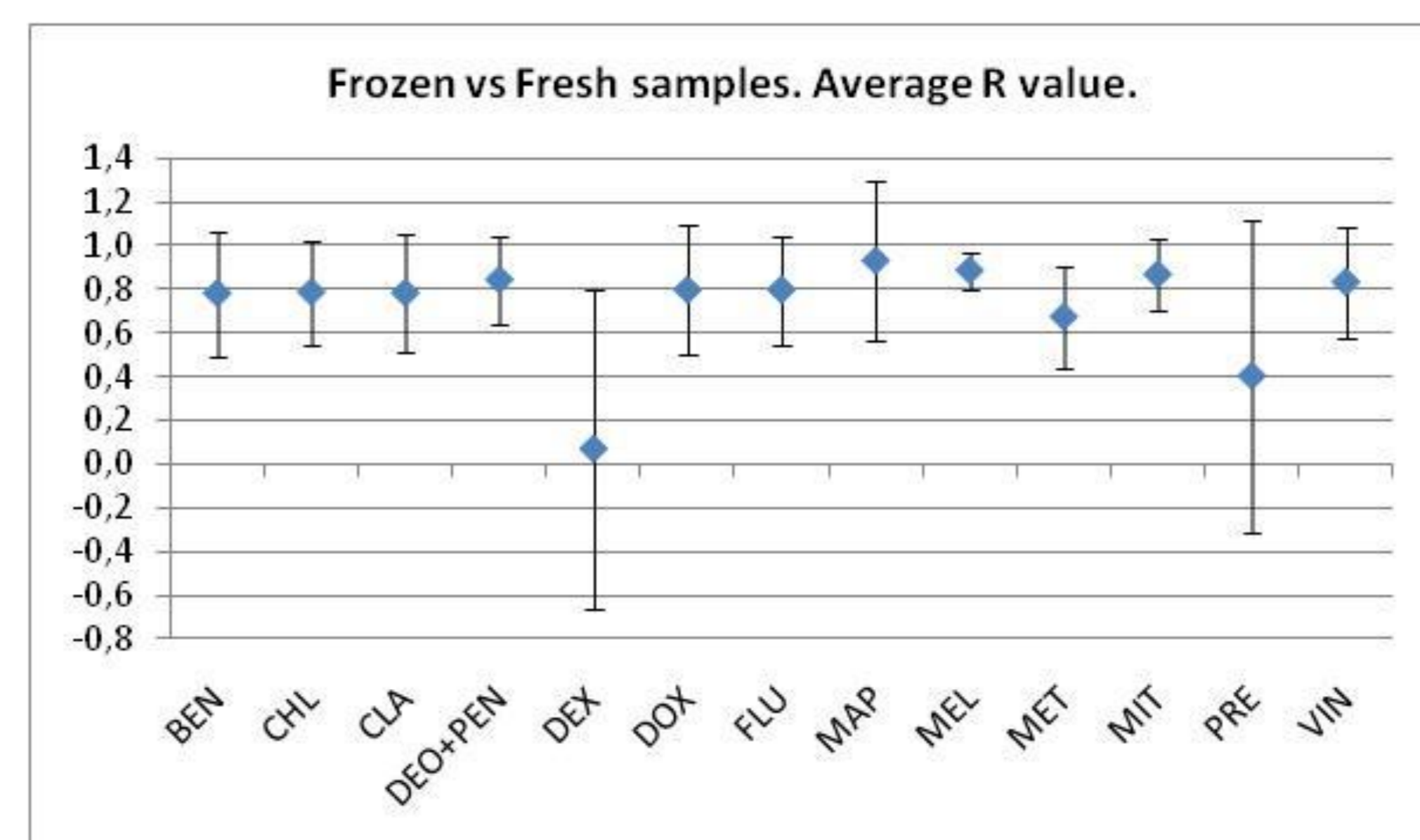


Figure 4. En el presente gráfico se muestra la correlación obtenida para cada uno de los fármacos ensayados. De los 13 fármacos ensayados once de ellos presentaron una buena correlación con un coeficiente  $R \geq 0,7$ . Cabe destacar que aquellos fármacos que producían una mayor apoptosis en las células leucémicas, presentaban mejor correlación entre las condiciones ensayadas, mientras que las peores correlaciones fueron observadas para aquellos fármacos en los que la respuesta citotóxica fue más débil.

## CONCLUSION

El ensayo exvivo realizado mediante la plataforma ExviTech® permite analizar la respuesta de las células patológicas a la acción de los fármacos citotóxicos, independientemente de que se realice sobre linfocitos recién aislados a partir de muestra fresca de SP o linfocitos aislados previamente congelados.

## Acknowledgements

Special Thanks to the Patients and Hospitals for Providing the Samples

- ❖ University of Salamanca Hospital
- ❖ Hospital Niño Jesus, Madrid
- ❖ Hospital Vall de Hebron, Barcelona

Grants supporting this work:  
Parques Andalucía 2007 (PCT-090100-2007-33), MICINN  
Parques Salamanca 2009 (PPT-010000-2009-12),  
MICINN  
ADE Nuevas Indicaciones de Fármacos 2008