



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Optimización de ensayos de quimiosensibilidad en células primarias de neoplasias hematológicas

Nadine Bestard Cuche

Grau de Bioquímica

Any acadèmic 2017-18

Treball tutelat per Silvia Elena Fernández De Mattos

Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball:

Citarbina, Gemcitabina, *Ex vivo*, Idarrubicina, Leucemia mieloide aguda, Linfoma de células del manto, Oxaliplatino, Sorafenib, Quimiosensibilidad

Índice

RESUMEN	3
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.....	4
1.2. LINFOMA DE CÉLULAS DEL MANTO	6
1.3. IMPORTANCIA DE LOS ENSAYOS DE QUIMIOSENSIBILIDAD	9
1.3.1. <i>Ensayos en Leucemias linfocíticas crónicas de células B (B-CLL)</i>	10
1.3.2. <i>Ensayos en Leucemias mieloides agudas (AML)</i>	11
1.2.3. <i>Ensayos en Leucemias linfoblásticas agudas (ALL)</i>	12
2.OBJETIVOS	13
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3.MATERIAL Y MÉTODOS	14
3.1. MANIPULACIÓN DE CULTIVOS CELULARES.....	14
3.2. LÍNEA CELULAR	14
3.2.1. <i>Descongelación</i>	14
3.2.1 <i>Mantenimiento</i>	15
3.3. CULTIVOS PRIMARIOS	15
3.3.1. <i>Aislamiento de células primarias</i>	15
3.3.2. <i>Descongelación y mantenimiento</i>	16
3.4. VIABILIDAD	16
3.5. ELECCIÓN DE LAS DOSIS DE LOS FÁRMACOS.....	18
3.4.1. <i>Línea celular</i>	18
3.4.2. <i>Células primarias AML</i>	18
3.5. ANÁLISIS DE DATOS.....	19
4.RESULTADOS	20
4.1. RESULTADOS DE LA LÍNEA CELULAR	20
4.2. RESULTADOS DE LAS CÉLULAS PRIMARIAS DE AML.....	21
4.2. RESULTADOS EN LAS CÉLULAS PRIMARIAS DE MCL.....	21
5. DISCUSIÓN	25
6.CONCLUSIONES	26
7.BIBLIOGRAFÍA	27

Resumen

Para aportar tratamientos individualizados en terapias antitumorales es de gran utilidad el estudio de la respuesta de las células del paciente, en cultivos *ex vivo*, a los posibles fármacos que se le pueden suministrar. Esto es de especial interés en neoplasias hematológicas en que la obtención de células primarias se puede realizar por procedimientos poco invasivos. En este trabajo se ha llevado a cabo el estudio de la posible aplicabilidad de los ensayos *ex vivo* como método para obtener un valor predictivo de la respuesta clínica con células primarias de un paciente de leucemia mieloide aguda (AML) y de un paciente de linfoma de células del manto (MCL). En las primeras no se han podido obtener datos concluyentes dado la baja viabilidad de las células tras su descongelación. En las de MCL se observó una sensibilidad elevada a uno de los fármacos del régimen GEMOX-R, con el que el paciente había sido tratado, lo que se correlaciona con su remisión con el tratamiento. Sin embargo, hay variabilidad en el comportamiento de las células tras cada descongelación por lo que aún es necesario realizar más estudios para optimizar el método.

Abstract

To provide individualized treatments in antitumor therapies, it is of great interest to study the cells' response to different drugs options in ex vivo assays, specially in hematological malignancies in which the obtention of primary cells does not require invasive interventions. In this final degree project, the possible application of ex vivo assays as a good predictive marker was studied through the analysis of AML and MCL primary cells' response. We could not obtain conclusive data from the AML study due to the low viability of cells after the thawing process. On the other hand, MCL primary cells were sensible to one of the drugs from the GEMOX-R regimen, with which the patient had been treated achieving complete remission. However, the behaviour of the cells was not consistent between experiments, so more studies are needed for optimising the method.

1. Introducción

1.1. Leucemia mieloide aguda

Las leucemias son un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas todas ellas por una mutación adquirida que induce una proliferación de precursores hematopoyéticos¹. Estas pueden ser de desarrollo agudo o crónico y provenir de precursores de la línea mieloide o linfoide. Como su nombre indica la **leucemia mieloide aguda** (**AML** por sus siglas en inglés) se caracteriza por afectar a las células mieloides y por tener una proliferación rápida. Esta proliferación conduce a una acumulación de mieloblastos o blastocitos que impiden la correcta producción del resto de células sanguíneas. Por ello el diagnóstico de AML suele ir acompañado de anemia, trombocitopenia y neutropenia.²

La AML es el tipo de leucemia aguda más común en las personas adultas.² La incidencia global es de 3,4 casos por cada 100000 personas. En adultos mayores aumenta la probabilidad de presentar AML. De hecho, la proporción en mayores de 80 años es de más de 20 casos por 100000 personas, siendo la media de edad de 70 años, la cual ha ido incrementándose en las últimas décadas.³

Si no es tratada los pacientes suelen morir en unas semanas, aunque en algunos adultos puede darse una progresión clínica más lenta.

El tratamiento más usado hoy en día consta de la **citarabina** combinado con una antraciclina, como la **idarrubicina**. Con este tratamiento aproximadamente entre el 50% y 75% de adultos con AML alcanzan una remisión completa. Sin embargo, únicamente entre el 20% y el 30% logran una supervivencia a largo plazo, visto que la gran mayoría mueren a causa de la enfermedad, principalmente por la presencia de recaídas.³

La citarabina es un antineoplásicoanálogo a la pirimidina, antimetabolito de la deoxycitidina (Fig. 1). Una vez en la célula, es metabolizada por una quinasa a citarabina trifosfato (ARA-CTP), su metabolito activo. Aún no se conoce completamente el mecanismo de acción, pero parece que actúa a través del bloqueo de la DNA polimerasa. Actúa, por lo tanto, durante la replicación del DNA impidiendo la progresión de fase G1 a fase S. También disminuye la velocidad de elongación de la cadena de DNA.⁴ Su eficiencia puede verse modificada por variaciones genéticas en algunos genes clave, implicados en el metabolismo de Ara-C, como genes que codifican para la quinasa que produce el metabolito activo ya comentada o sus reguladores, enzimas inactivadoras como la citidina deaminasa o transportadores de nucleósidos que también transportan Ara-C.⁵

La idarrubicina es una antraciclina de segunda generación (Fig. 2). Como parte de su mecanismo de acción, al igual que en todas las antraciclinas, puede ser clave su transformación a un alcohol derivado, el idarrubicinol, catabolizado por reductasas.⁶ Actúa intercalándose en el DNA induciendo una rotura y parando así la progresión del ciclo celular. También forma parte de los "TOP2 poison",⁷ fármacos que interaccionan con la topoisomerasa II en el momento en que esta realiza un doble corte en la cadena de DNA, de forma que se estabiliza el complejo impidiendo que se vuelvan a ligar las hebras de DNA.⁸

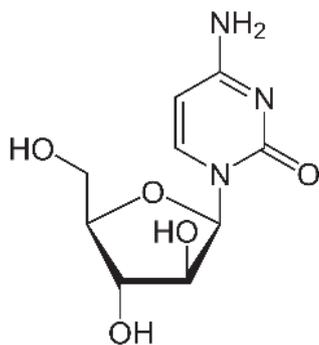


Figura 1: Estructura química de la citarabina

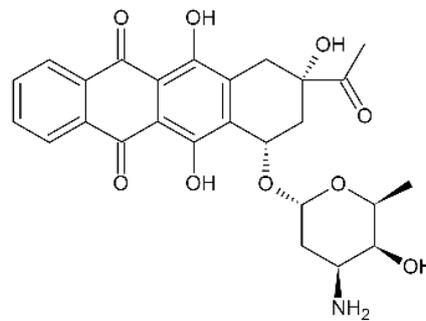


Figura 2: estructura química de la idarrubicina

Por otro lado, se están diseñando nuevos fármacos para tratar la AML gracias al creciente conocimiento que se va adquiriendo sobre las alteraciones genéticas predominantes en esta enfermedad y la localización de dianas moleculares concretas. Entre estos, se incluyen fármacos con diversas dianas, como antígenos exclusivos de los blastos de AML (CD33), bombas que expulsan otros quimiofármacos de la célula, enzimas implicadas en la proliferación celular como la quinasa FLT3 (Fms-like tyrosine kinase3) o genes antiapoptóticos como BCL-2.³

En esta categoría de fármacos se encuentran el **sorafenib** (Fig. 3) y el midostraurin, inhibidores del receptor tirosina quinasa FLT3.

El sorafenib se diseñó inicialmente como inhibidor de la quinasa Raf-1⁹ pero se ha visto que también tiene actividad inhibitoria para otras quinasas, entre las cuales destaca FLT-3,¹⁰ por lo que se considera un inhibidor de multiquinasas.¹¹ Está aprobado para tratar hepatocarcinomas y carcinomas renales avanzados y está siendo estudiado para tratar AML.¹¹ En la AML es frecuente una señalización aberrante de las quinasas, como las vías de señalización de RAF/MEK/ERK o la de PI3K/AKT. Esta señalización aberrante tiene

diversos orígenes: entre otros, pueden estar implicados receptores tirosina quinasa como FLT3. Por ello la inhibición de estas vías de señalización desreguladas son una estrategia interesante para el tratamiento de AML, en especial para aquellos casos en los que FLT3 se encuentra mutado.¹²

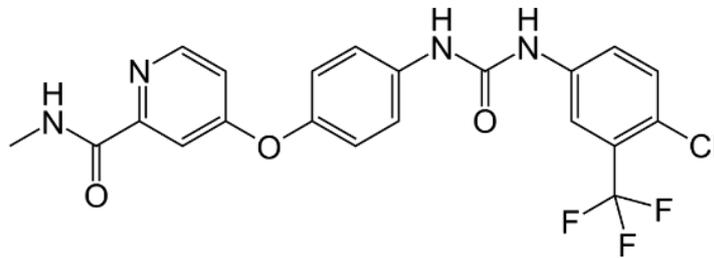


Figura 3: Estructura química del sorafenib

1.2. Linfoma de células del manto

Los linfomas son tumores de células de tejidos linfáticos. Existe una gran variedad, por lo que se han clasificado según sus características clínicas y biológicas.¹³ La clasificación más general divide los linfomas en dos tipos: los linfomas de Hodgkin y los linfomas no-Hodgkin. El **linfoma de células del manto (MCL)** forma parte de los linfomas no-Hodgkin y al igual que el 85-90% de éstos deriva de células B.¹⁴ El nombre deriva del crecimiento del tumor en los estadios tempranos, este se expande entorno al centro germinal, en la “zona del manto” (mantle zone) del folículo linfoide secundario.¹⁵ Se ha demostrado que se caracterizan por la translocación t(11;14) y la sobre-expresión de la ciclina D1.¹⁶

Es un tipo de linfoma poco frecuente, entre un 3 y un 10 % de los linfomas no-Hodgkin, con una incidencia total de aproximadamente 5 afectados de cada 1000000 personas. La media de edad es de entre 60 y 65 años.¹⁷ Sin embargo, es uno de los más agresivos. El MCL tiene una mala prognosis: la media de edad de supervivencia no llega a 5 años.¹⁸

El método tradicional para el tratamiento de MCL consiste en una combinación de 4 fármacos: cyclophosphamida, doxorubicina, vincristin y prednisona (CHOP).¹⁹ Se suele combinar este método convencional con tratamientos más intensivos seguidos de autotransplante de células madre.²⁰ También se han desarrollado nuevas terapias con moléculas clave como diana, como a la quinasa de Bruton (BTK) o al fosfoatidilinositol 3-quinasa (PI3K). Sin embargo, las constantes recaídas siguen siendo una característica recurrente.²¹

Un régimen para el tratamiento del MCL con recaídas para el que recientemente se han encontrado evidencias de su eficacia es el régimen “**GEMOX-R**”. Combina la **gemcitabina** y el **oxaliplatino** con **rituximab**.

El oxaliplatino interacciona con el ADN formando puentes intra- e inter-catenarios que entrañan una interrupción de la síntesis de ADN. (Fig. 4) Se caracteriza por lo tanto por un arresto en la fase G2/M. Se ha observado que producen la translocación de Bax a las mitocondrias con una liberación del citocromo C, lo que conduce a la apoptosis.²²

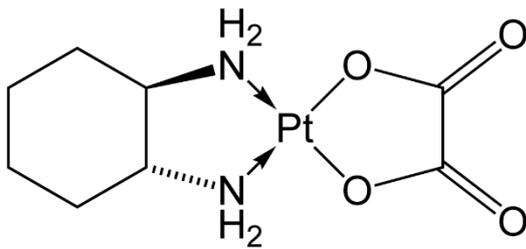


Figura 4: Estructura química del oxaliplatino

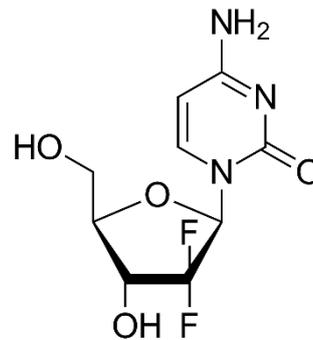


Figura 5: Estructura química de la gemcitabina

La gemcitabina, al igual que la citarabina, es un análogo del nucleósido deoxicitidina. Lleva usándose más de 15 años para el tratamiento del cáncer de páncreas y su uso se está extendiendo a otros carcinomas, en especial combinado con fármacos con base de platino como el cisplatino o el oxaliplatino (Fig. 5). Una vez en la célula, debe ser activado a trifosfato por diferentes enzimas que catabolizan las 3 fosforilaciones consecutivas. Su principal mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de DNA, incorporándose durante la elongación, permitiendo que se incorpore un único deoxinucleótido más a la cadena. De esta forma, se inhibe la elongación y también impide la reparación del DNA (Fig. 6). Además, la gemcitabina inhibe enzimas relacionadas con el metabolismo de los deoxinucleótidos que podrían degradar el fármaco, alargando su vida útil. Por último, también se encuentra implicada en la inducción de la apoptosis mediante la señalización de caspasas²³

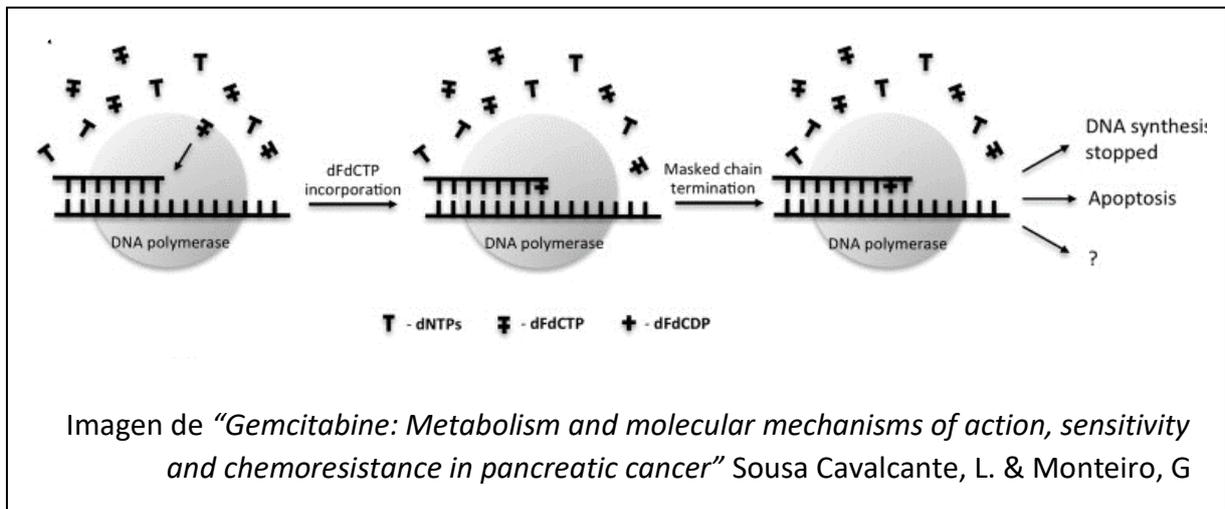


Figura 6: Mecanismo de acción de la gemcitabina trifosfato (dFdCTP). Durante la síntesis de DNA es incorporado por la DNA polimerasa, seguidamente de otro deoxinucleótido (dNTP). La incorporación de este produce el “enmascaramiento de la terminación de cadena”, impidiendo la elongación y la reparación del DNA, lo que conduce a apoptosis y a otros efectos celulares por mecanismos aún no del todo elucidados.

Por último, el rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico antiCD20-IgG1 que ha mostrado eficacia frente a recaídas de linfomas de células B.²⁴ CD20 es una proteína de superficie celular prácticamente exclusiva de células B maduras. El anticuerpo es una quimera entre un IgG humano con una región de unión a CD20 diseñada por ingeniería genética y de origen murino (Fig. 7). Al unirse a las células B induce la muerte celular por apoptosis.²⁵

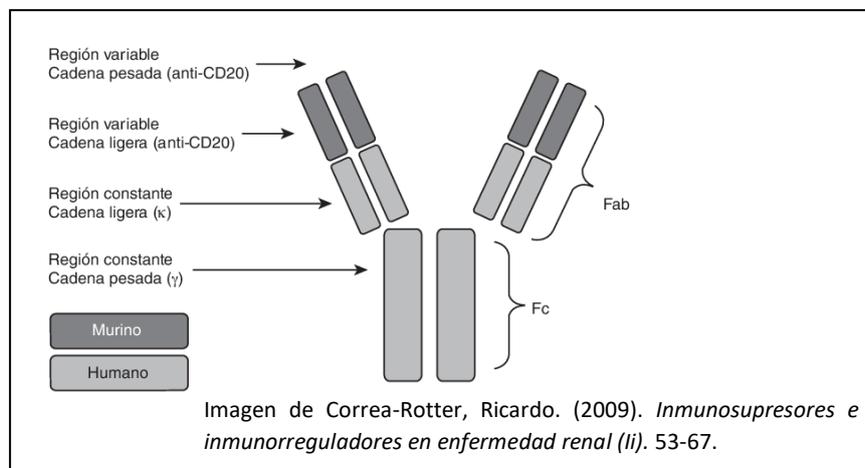


Figura 7: Estructura del rituximab. Es un anticuerpo quimérico dirigido contra el antígeno CD20. Tiene una región variable murina, tanto de las cadenas pesadas como las ligeras, y una región constante humana formada por las cadenas κ y γ (IgG1).

Ya se había demostrado la eficiencia del régimen GEMOX-R en el linfoma difuso de células grandes y, más recientemente, para linfomas de células B en general.^{24,26} Después de demostrarse su eficiencia para linfomas de manto (MCL) en concreto,²⁷ se ha realizado un estudio más extenso demostrándose que el fármaco más efectivo del régimen es el oxaliplatino.²⁸

Para ello se evaluaron los fármacos en un panel de líneas celulares de MCL, midiendo la viabilidad celular y determinando la apoptosis celular midiendo los niveles de caspasas. También se realizaron ensayos tratando con oxaliplatino células derivadas de pacientes en ensayos *ex vivo* para confirmar los resultados.

Por otro lado, se compararon los fármacos del régimen GEMOX con el nucleósido citarabina (Ara-C) y con cisplatino, el compuesto básico basado en platino. Para ello se realizaron sinergias en líneas celulares tratando con oxaliplatino o cisplatino conjuntamente con Ara-C. Se constató que el oxaliplatino tiene mayor efecto con este nucleósido que con gemcitabina y que el Ara-C únicamente presenta un efecto sinérgico con el oxaliplatino y no con el cisplatino.²⁸

1.3. Importancia de los ensayos de quimiosensibilidad

Una de las razones principales del fallo de los tratamientos en quimioterapia es la resistencia a los fármacos, que puede ser tanto intrínseca como adquirida. Para determinar dichas resistencias son de gran utilidad los ensayos *ex vivo*. En esta clase de ensayos, se procede a la extracción de las células tumorales de un paciente y se mantienen en condiciones de cultivo.²⁹

Con este modelo experimental se puede determinar de forma rápida y precisa la resistencia o la sensibilidad de las células del paciente mediante ensayos de quimiosensibilidad. Los tres ensayos más usados hoy en día para medir la viabilidad son los ensayos de **MTT**, que relacionan la citotoxicidad con la disminución de la actividad metabólica gracias a la reducción de una sal de tetrazolio (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolio bromida) a un colorante lila (formazan) al reaccionar con la succinato deshidrogenasa mitocondrial; los de **SRB** (Sulforhodamina B), que miden el contenido de proteína celular³⁰ y los de **ATP-TCA** (ATP-tumor chemosensitivity assay), que la relaciona con una disminución de una biomolécula esencial, el ATP.³¹

La respuesta a este *screening* puede tomarse en cuenta para cada paciente antes de empezar las sesiones de quimioterapia y aportar así un tratamiento individualizado.²⁹ Estos estudios no están aprobados para uso rutinario en los tratamientos de primera línea, aunque son de sumo interés en las segundas líneas de tratamientos, en las que los protocolos de actuación no son siempre tan definidos.³²

Ya se han realizado estudios comparando datos de quimiosensibilidad, medidos ya sea con MTT, SRB o ATP-TCA, con la respuesta a una terapia. Se ha encontrado una correlación entre la eficacia de la terapia y la respuesta de las células en carcinomas de mama, de colon, de pulmón, gástricos, en melanomas, y en leucemias.³¹

Los ensayos en leucemias resultan de especial interés, visto que se trata de una neoplasia hematológica. La obtención de células primarias de neoplasias hematológicas se puede realizar con métodos poco invasivos a partir del plasma de una simple extracción sanguínea y obteniendo habitualmente un gran número de células de un alto grado de pureza,³³ de allí la utilidad de determinar el valor predictivo de los estudios de quimiosensibilidad en este tipo de neoplasias.

A continuación, se describirán a modo de ejemplo algunos ensayos de quimiosensibilidad realizados en células primarias de diferentes leucemias.

1.3.1. Ensayos en Leucemias linfocíticas crónicas de células B (B-CLL)

La leucemia linfocítica crónica (CLL) es una enfermedad incurable con una respuesta muy variable a las diferentes terapias. En las últimas décadas se han empezado a utilizar análogos de nucleósidos, como la fludarabina (FLD) para el tratamiento de CLL, además del tratamiento estándar con clorambucilo (CLB). Por ello, era de interés encontrar un ensayo que fuera capaz de predecir la respuesta clínica del paciente a las diferentes opciones de tratamiento.³⁴

En los estudios realizados, se ha demostrado que diferentes aproximaciones permiten obtener valores predictivos de la respuesta clínica a FLD, como realizar ensayos de quimiosensibilidad *in vitro* para obtener la concentración de fármaco letal para el 50% de las células (LC50) o realizar ensayos DiSC (“differential staining cytotoxicity”), un test de respuesta a fármacos en ensayos *ex vivo*.³⁵ Sin embargo, el uso de la determinación de la inducción de la apoptosis ha presentado resultados controvertidos. Se han correlacionado las respuestas *in vitro* con los diferentes estadios de la enfermedad, pero a pesar de la relación de los estadios con la respuesta clínica, no se ha encontrado una correlación directa entre los ensayos *in vitro* y la respuesta clínica.²⁹

También se han realizado estudios del posible valor predictivo de ensayos *in vitro* con el tratamiento estándar (CLB). Se destaca por ejemplo un estudio de Silber R *et al.* de 1994 en el que se realizaron ensayos de quimiosensibilidad con células de 65 pacientes con B-CLL. Se comparó la sensibilidad de estas células a CLB con la respuesta de los pacientes a este mismo fármaco.

La sensibilidad *ex vivo* se determinó mediante un ensayo de MTT, expresando los resultados como la concentración de fármaco necesaria para inhibir un 50 % de la viabilidad (IC_{50}). Se dividieron los linfocitos en “resistentes” si tenían una IC_{50} igual o superior a 61,0 μ M (mediana de todas las IC_{50} calculadas) y “sensibles” si la IC_{50} era inferior a este valor. Se volvió a realizar una determinación una vez comenzado el tratamiento y se observó que en un 86 % de los casos el valor de IC_{50} incrementó significativamente. Visto que se demostró que la IC_{50} no tenía una correlación con el estadio de la enfermedad, este hecho se puede explicar por la eficacia del tratamiento sobre las células más sensibles, con una selección de la subpoblación resistente y el consecuente incremento de la IC_{50} . Por otro lado, además destacaron que en un 20% de los pacientes no tratados también se obtuvieron fluctuaciones de este valor, por ello insisten sobre el hecho que otros factores a parte del tratamiento pueden influir en la resistencia al fármaco.

La sensibilidad al tratamiento en los pacientes se determinó mediante el contado de linfocitos y por el criterio del “Eastern Cooperative Oncology Group”. Se vio que la respuesta al tratamiento fue significativamente mejor en los pacientes cuyos linfocitos fueron clasificados como “sensibles” que en aquellos en los que fueron clasificados como “resistentes”. Se concluye que este ensayo podría poseer un valor predictivo para esta enfermedad, aunque se debería repetir utilizando un mayor número de pacientes para asegurarlo.³⁴

1.3.2. Ensayos en Leucemias mieloides agudas (AML)

En AML se han realizado estudios para determinar el valor predictivo de los ensayos *in vitro* de un solo fármaco como citarabina (Ara-C)³⁶, daunorubicina (DNR) o inhibidores de topoisomerasa II; y de combinaciones como en un estudio de Sargent, J.M. *et al.* en el que se probaron combinaciones de 4 fármacos: adriamicina, Ara-C, 6-thioguanina y mitoxantrona. Las resistencias a estos fármacos *in vitro* se han correlacionado ya sea con una menor remisión, mayor probabilidad de recaídas o con factores de mala prognosis como la edad.²⁹

Como ejemplo de estudio realizado con células provenientes de una AML, se podrían destacar los datos obtenidos por Norgaard *et al.* en 2001. Realizaron el estudio con 85 pacientes a los que se les diagnosticó AML. Estos pacientes fueron tratados con citarabina (Ara-C) combinado con Aclaraubicina-A (Acla), mitoxantrona o idarrubicina. La respuesta clínica fue evaluada mediante los criterios del “Cancer and Leukemia Group B”. Los blastos obtenidos de estos pacientes fueron cultivados *in vitro* y tratados con los mismos fármacos antes mencionados. La viabilidad se midió con ensayos de MTT y se expresaron los resultados como logaritmos de la LC 50.

Comparando los resultados *in vitro* con los datos clínicos de los tratados con Acla y Ara-C en el primer ciclo de quimioterapia, se vio que la resistencia a Acla era menor en los pacientes que presentaron una remisión completa, sin embargo no se observó una diferencia significativa con el Ara-C. Por otro lado, se realizaron estudios estadísticos comparando esta respuesta *in vitro* a otros parámetros clínicos como la duración global de supervivencia o la remisión completa continua. Se observó que, aunque ningún valor de resistencia de los fármacos por separado tenía un valor pronóstico significativo, sí era significativo en el caso de tener en cuenta el perfil de resistencia a ambos fármacos (Ara-C y Acla).

Se concluyó que, a pesar de que el número de pacientes es demasiado reducido como para poder realizar afirmaciones contundentes, se aprecian evidencias de que la resistencia a fármacos medida con quimioensayos predice la respuesta clínica tanto a corto como a largo término, teniendo en cuenta que las combinaciones de fármacos tienen un mejor valor predictivo.³³

1.2.3. Ensayos en Leucemias linfoblásticas agudas (ALL)

Se han realizado diferentes estudios comparando el valor predictivo de la resistencia *in vitro* a fármacos para el tratamiento de las leucemias linfoblásticas agudas (ALL). Entre estos se encuentran estudios con prednisolona (PRD), L-Asparaginasa (L-ASP) y vincristina (VCR) donde se ha encontrado una correlación entre la resistencia *in vitro* y la respuesta clínica. También se ha visto que con la edad aumenta la resistencia a un amplio panel de fármacos (Ara-C, L-ASP, PRD...), tanto en respuestas clínicas como *in vitro*.²⁹

Uno de los estudios de quimiosensibilidad de células primarias de ALL tenía como objetivo principal comparar la resistencia *in vitro* a la prednisolona (PRD), medida mediante un ensayo de MTT, con la respuesta clínica a corto plazo a una monoterapia de PRD y con la respuesta a largo plazo después de la quimioterapia combinada. El estudio se realizó en 166 niños de hasta 18 años. Se dividieron en un grupo con “buena respuesta a PRD”, si

presentaban menos de 1000 células leucémicas/ μL , y otro de “respuesta baja a PRD” si presentaban valores más elevados.

Se vio que los de “baja respuesta” obtuvieron valores de resistencia *in vitro*, medida mediante LC50, 88 veces mayores que los de “buena respuesta”. En ambos grupos se relacionaron los valores altos de resistencia con una peor respuesta clínica, aunque la diferencia únicamente es significativa en el grupo de “buena respuesta”.

Por otro lado, también se realizó un análisis *in vitro* de 12 otros fármacos y se observó una correlación entre los valores de LC50 de la prednisolona y los obtenidos con los otros fármacos, así como en las respuestas a cada uno de los 12 fármacos comparadas entre sí. Las correlaciones entre fármacos más parecidos estructuralmente fueron más elevadas. Eso indica que existe una resistencia cruzada a los diferentes fármacos, pero se reconocen igualmente las actividades específicas de cada fármaco.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Este estudio pretende establecer la repetibilidad y reproducibilidad de los ensayos *ex vivo* y, en la medida de lo posible, establecer su valor predictivo para pacientes con neoplasias hematológicas.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar ensayos de quimiosensibilidad *ex vivo* con células primarias de las neoplasias hematológicas AML y MCL utilizando fármacos convencionales para el tratamiento de estas enfermedades.
- Determinar la respuesta midiendo la viabilidad celular y calcular la IC_{50} .
- Comparar las IC_{50} con las concentraciones plasmáticas obtenidas en los pacientes tratados con estos fármacos, con tal de determinar la sensibilidad/resistencia de las células estudiadas.

3. Material y Métodos

3.1. Manipulación de cultivos celulares

Para una correcta manipulación de los cultivos celulares, es primordial seguir protocolos de seguridad y poseer equipamiento adecuado para mantener la esterilidad.

Para este trabajo se utilizó una cabina de bioseguridad de tipo II. Antes y después de cada uso se esterilizó la campana poniendo 5 minutos la luz ultravioleta. Además, la superficie fue limpiada con etanol 70 %. El material fungible fue autoclavado si no venía esterilizado. Los reactivos y medios únicamente se abrieron dentro de la campana. Tanto los envoltorios del material como de los reactivos o medios también fueron rociados con etanol 70 % antes de ser introducidos en la campana.

Los medios de cultivo y los reactivos se guardaron en nevera a 4 °C y los reactivos a -20 °C. Para atemperarlos se utilizó un baño de agua a 37 °C.

3.2. Línea celular

Con tal de poner en práctica todos los procedimientos antes de utilizar las células primarias se realizaron los experimentos con la línea celular JURKAT. Esta línea de leucemia aguda fue desarrollada a partir de la sangre periférica de un paciente de 14 años que presentaba ALL.^{38,39}

3.2.1. Descongelación

La línea celular estaba conservada en un tanque de nitrógeno líquido, es decir a -195 °C.

Para descongelar la línea se empezó añadiendo 15 ml de medio RPMI L-glutamina i 25 mM HEPES en un Corning de 50 ml a atemperar a 37 °C. A continuación, se extrajo el criovial del nitrógeno líquido y se le añadió 1 ml del medio atemperado. A medida que se descongelaba se pasó con una micropipeta al Corning de 50 ml, con el resto del medio RPMI 1640. Este paso se repitió hasta que quedara vacío el criovial.

Seguidamente se centrifugó mediante una centrifuga a 1800rpm durante 5 minutos con tal de precipitar las células. El sobrenadante fue descartado. El *pellet* fue resuspendido con 5 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado (FBSi) y con un 1% de penicilina-estreptomicina.

3.2.1 Mantenimiento

Las células se incubaron a 37 °C, 98 % de humedad relativa y 5 % de dióxido de carbono.

Cada dos días las células se contaron mediante el uso de la cámara de Neubauer, contando las células en un microscopio óptico invertido. Para diferenciar las células vivas de las muertas, se utilizó azul de tripano, realizando una dilución 1:1, con 10 µl de colorante y 10 µl de la suspensión de células. El azul de tripano únicamente puede entrar en células cuyas membranas están alteradas, por ello las células vivas no se tiñen, mientras que las muertas incorporan el azul de tripano quedando de color azul.⁴⁰

Conocer el número de células permitió mantenerlas a una concentración óptima de 400000 células/ml, añadiendo el volumen pertinente a cada vez. Al llegar a los 30 ml de volumen máximo, se descartaba el volumen de la suspensión de células sustituyéndolo por medio nuevo para mantener el volumen final y la concentración de células constante.

3.3. Cultivos primarios

Durante este proyecto de fin de grado, se ha trabajado con células primarias provenientes de un paciente al que se le diagnosticó leucemia mieloide aguda (AML) y las de un paciente con linfoma de células del manto (MCL) siguiendo los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Al paciente de AML se le administró Ara-C, idarrubicina y midostraurin . El paciente de MCL fue tratado con el régimen GEMOX-R que consistía en gemcitabina 1000 mg/m², oxaliplatino 100 mg/m² y rituximab 375 mg/m² cada 21 días. Ambos alcanzaron una remisión completa.

3.3.1. Aislamiento de células primarias

Las células para los cultivos primarios de AML y MCL ya se habían obtenido a partir de muestras de sangre periférica de los pacientes antes de que fueran tratados. El procedimiento de obtención y el uso de las muestras fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de las Islas Baleares (#IB 1098/08 PI). Los pacientes dieron su consentimiento informado siguiendo los criterios del CEI-IB y de la Declaración de Helsinki.

El protocolo para aislar las células de interés de las muestras de plasma fue realizado en diciembre de 2016.

Se midió el volumen de sangre de las muestras obtenidas por punción y transportadas en un tubo con heparina de litio. Se pasó a un tubo de Corning de 15 ml y se diluyó hasta 8 ml con PBS. Se añadieron 4 ml de Ficoll_Paque™ PLUS en un nuevo tubo en el que se vertieron los 8 ml de sangre con PBS delicadamente para no mezclar las fases.

Después de una centrifuga a 2000 rpm de 20 minutos a temperatura ambiente y sin freno se pudieron recoger los linfocitos del anillo entre el Ficoll y el plasma.

Se pasaron a otro tubo de 50 ml y se realizaron dos centrifugaciones a 1500 rpm de 10 minutos a temperatura ambiente añadiendo 50 ml de PBS antes de centrifugar y descartando el sobrenadante. Después de la última centrifugación se resuspendieron las células en 1 ml de medio RPMI filtrado y suplementado con 20% de FBS i penicilina-estreptomicina para contarlas. Finalmente se añadió el medio necesario para dejar las células a una densidad de 1000000 células/ml

Una vez obtenidas las células se congelaron en un medio de congelación compuesto por 90% de FBSi y 10% de DMSO.

3.3.2. Descongelación y mantenimiento

El protocolo de descongelación seguido cada vez que se descongeló un vial fue muy parecido al de descongelación de las líneas celulares con algunas modificaciones: el medio se suplementó con 20 % FBSi en lugar de 10 %, el tiempo de centrifuga se alargó a 10 minutos y la cantidad de medio añadido para resuspender las células fue de solo 1 ml para poder contarlas y luego añadir el medio necesario para dejar las células a 1000000 células/ml. Se dejaron a esta concentración al menos 1 hora antes de realizar cualquier experimento.

Las células primarias únicamente son viables los primeros días tras la descongelación.

3.4. Viabilidad

Con ambos tipos de células se realizaron ensayos de viabilidad. Con esta clase de ensayos, se puede medir de forma precisa y objetiva el número de células vivas presentes en un cultivo. Esto permite evaluar cómo afecta un determinado fármaco a diferentes concentraciones, y calcular así su IC₅₀, es decir, la concentración de fármaco necesaria para inhibir un 50 % de la viabilidad.

La viabilidad se midió con CellTiter-Glo® Luminiscent assay Kit. Como se puede apreciar en la Figura 8, en esta clase de ensayos el contenido intracelular de ATP se cuantifica midiendo la luminiscencia producida por la reacción de ATP con la luciferasa y

con D-luciferina. El valor de ATP se correlaciona linealmente con el número de células viables.³¹

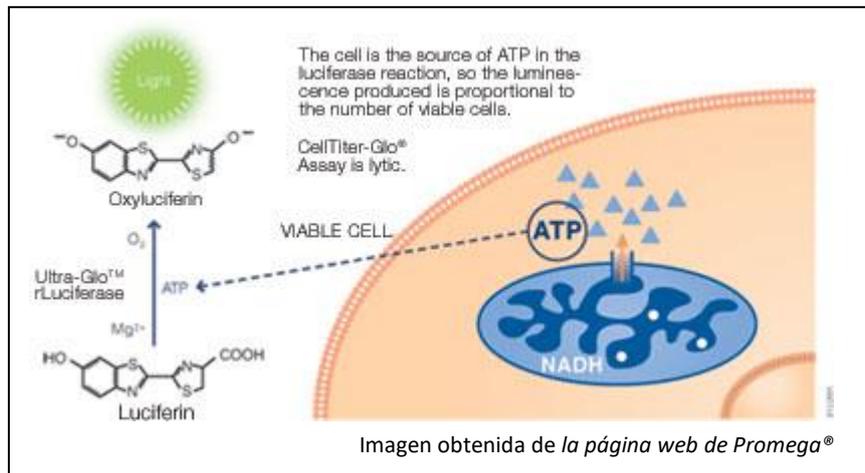


Figura 8: Esquema que ilustra el mecanismo de acción del Cell Titer-Glo®.

Las células se dejaron a una concentración de 400000 células/ml unas horas antes de realizar los experimentos.

Los ensayos con las líneas celulares y con las células primarias de AML se realizaron en placas de 12 pocillos, colocando 1990 µl de células a una concentración de 400000 células/ml en cada pocillo. Se realizaron los cálculos pertinentes para diluir los fármacos a una concentración tal que, añadiendo 10 µl de fármaco en los pocillos, se obtuvieran las concentraciones finales deseadas, detalladas para cada fármaco en el siguiente apartado.

Con las de MCL, el volumen total obtenido de suspensión de células a 400000 células/ml era menor. Para optimizar los ensayos se realizaron los tratamientos en placas de 24 pocillos con un volumen final de 400 µl.

Una vez tratadas las células, fueron incubadas a 37 °C, 98 % de humedad relativa y 5 % de dióxido de carbono durante el tiempo correspondiente.

Para medir la viabilidad, se empezó resuspendiendo las células subiendo y bajando suavemente el volumen con una pipeta, se añadieron 50 µl de esta suspensión junto a 50 µl de CellTiter-Glo® a temperatura ambiente en una placa Costar® de 96 pocillos. Cada pocillo de células se leyó por duplicado.

A las 0h y 24h se midió la viabilidad del control para tener una idea de la evolución de los cultivos. Una vez transcurridas las 24h, 48h o 72h se leyó la viabilidad de todos los pocillos.

3.5. Elección de las dosis de los fármacos

3.4.1. Línea celular

La prueba realizada con la línea celular se hizo tratándola con trifluoperazina.

La trifluoperazina es un antagonista del receptor de dopamina D2 aprobado como antipsicótico para el tratamiento de trastorno por ansiedad generalizado (Fig. 9).⁴¹ Recientemente se ha demostrado que tiene un efecto inhibitor del crecimiento del glioblastoma, el tumor maligno de cerebro más común.⁴²

Se trató con concentraciones de 0,5; 1; 5; 10; 15; 20 μM .

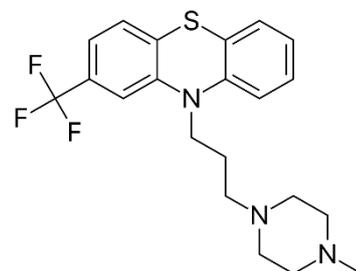


Figura 9: Estructura química de la trifluoperazina

3.4.2. Células primarias AML

Se ha estudiado la respuesta de las células primarias de AML a la citarabina (Ara-C), a idarubicina y a sorafenib.

Las concentraciones de fármacos utilizadas se eligieron acorde a estudios anteriores con células primarias *in vitro*, procurando incluir rangos de dosis inferiores a las concentraciones estimadas en plasma.

Para Ara-C se trató con 7 dosis de 0,15 μM a 10 μM porque ya se había observado que con 48 h de tratamiento las células sensibles tienen una IC_{50} menor a 6 μM ³⁷. En plasma se observaron concentraciones de hasta 20 μM .⁴³

Para el sorafenib se utilizó el mismo rango de dosis, visto que las IC_{50} encontrada en otros estudios suele ser menor a 5 μM ,^{44, 45} y no sobrepasa los 9 μM .⁴⁶ Además, en el plasma las concentraciones medidas son en torno a 10 μM .⁴⁷

La idarubicina se administró en dosis de 10 nM a 1000 nM al ver que en otros estudios se han reportado IC_{50} de en torno a 100 nM⁴⁸ y en plasma se llegan a alcanzar concentraciones de idarubicina superiores a 1000 ng/ml, equivalente a más de 2 μM .⁴⁹

3.3.3. Células primarias MCL

En las células de MCL se ha estudiado su respuesta *in vitro* a: oxaliplatino, gemcitabina y citarabina.

Se han utilizado rangos de concentraciones de hasta 40 μM para el oxaliplatino, hasta 10 μM para Ara-C y hasta 100 nm para la gemcitabina porque se habían utilizado en estudios anteriores con estos mismos fármacos en células de MCL.²⁸

3.5. Análisis de datos

Las gráficas se han realizado con GraphPad, programa con el que también se han calculado las concentraciones inhibitorias IC_{50} .

4.Resultados

4.1. Resultados de la línea celular

Con la línea celular JURKAT únicamente se realizó un experimento probando con dosis crecientes de trifluoperazina hasta 20 μ M. En la Figura 10 se puede observar una disminución drástica de la viabilidad, indicando una buena respuesta con una clara curva sigmoidea.

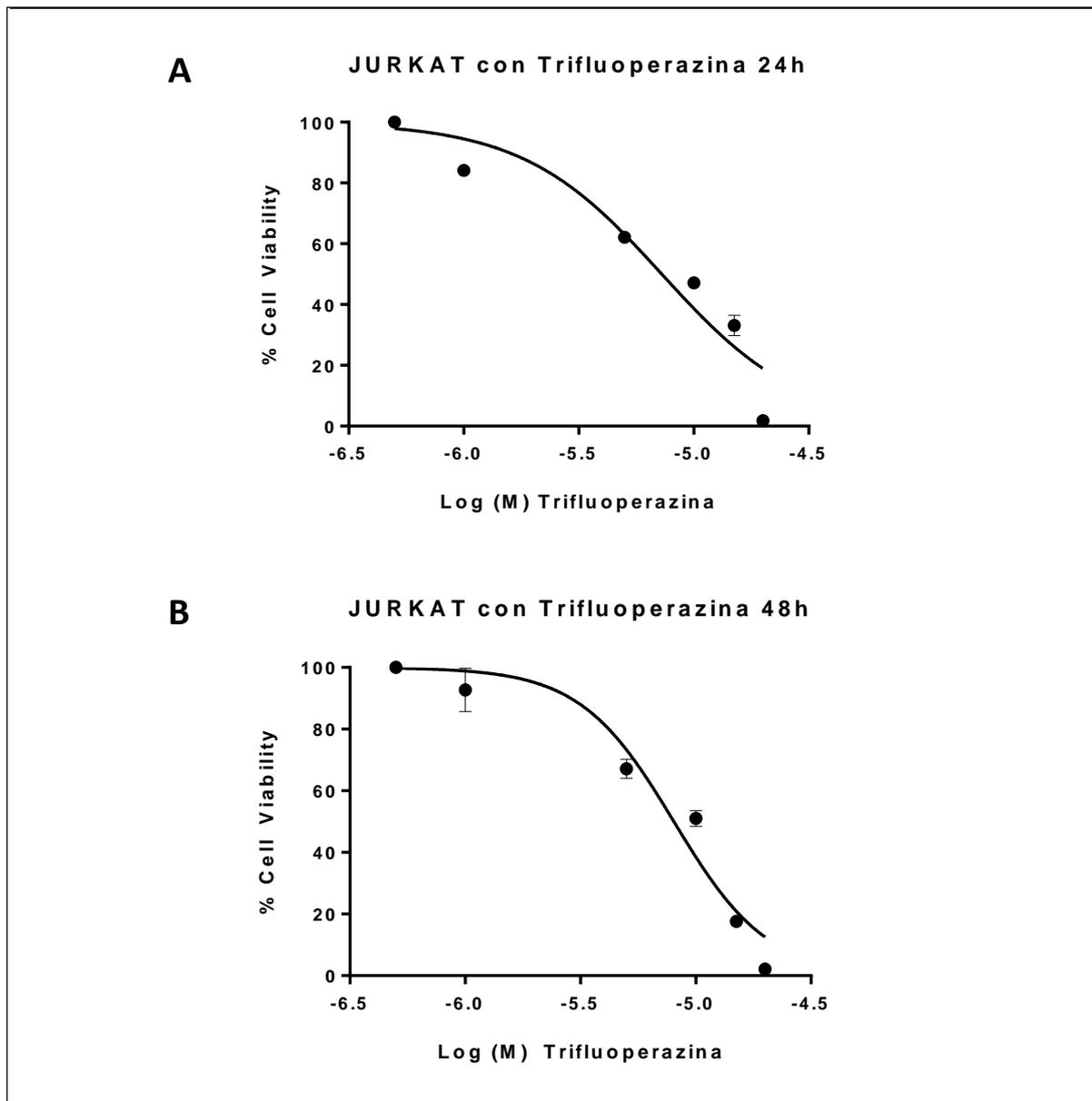


Figura 10: Efectos de trifluoperazina sobre la viabilidad celular de MCL. Las líneas celulares fueron tratadas con dosis de trifluoperazina 0,5; 1; 5; 10; 15; 20 μ M durante 24 h (A) y 48 h (B). Los gráficos representan el porcentaje relativo de células viables respecto a las células no tratadas. Los valores fueron obtenidos en una determinación realizada por duplicado.

4.2. Resultados de las células primarias de AML

En la Tabla 1, donde se presenta la evolución del control en los últimos ensayos con AML realizados, se puede observar una disminución muy pronunciada de la viabilidad a medida que pasan las horas. En el primer experimento que se presenta se puede ver que la viabilidad a las 48 h representa un 23,2 % respecto al valor inicial y a las 72 h únicamente 20,4 %. En el segundo experimento presentado la viabilidad llega a ser un 12,8 % en tan solo 48 h.

La evolución de los experimentos iniciales no se presentan visto que no se valoró la viabilidad a las 0 h.

	% Viabilidad respecto al Control 0h	
	Ensayo 1 AML	Ensayo 2 AML
0 h	100	100
24 h	51,4	36,8
48 h	23,2	12,8
72 h	20,4	--

Tabla 1: *Porcentajes de viabilidad a las 24 h, 48 h y 72 h respecto al valor a las 0 h de tratamiento de dos de los experimentos realizados con AML.*

No se observó una respuesta dosis-dependiente en ninguno de los fármacos probados, pero se atribuyó al mal estado de las células.

4.2. Resultados en las células primarias de MCL

4.2.1. Respuesta a Gemcitabina

Inicialmente con las células primarias de MCL se llevó a cabo un experimento probando la eficacia de la gemcitabina con dosis crecientes del fármaco hasta llegar a 100 nM. En la Figura 11 se puede apreciar que el fármaco no tiene ningún efecto perceptible sobre las células. Únicamente se realizó un experimento.

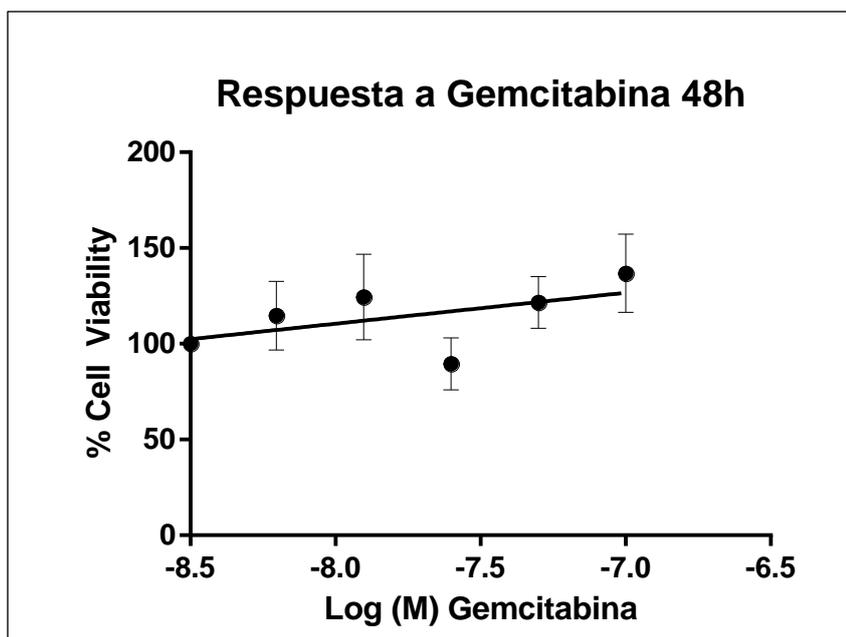


Figura 11: Efectos de la gemcitabina sobre la viabilidad de células primarias de MCL. Las células fueron tratadas con dosis de gemcitabina de 6,25; 12,5; 25; 50 y 100 nM durante 48h. El gráfico representa el porcentaje relativo de células viables respecto a las células no tratadas. Los valores fueron obtenidos en una determinación realizada por duplicado.

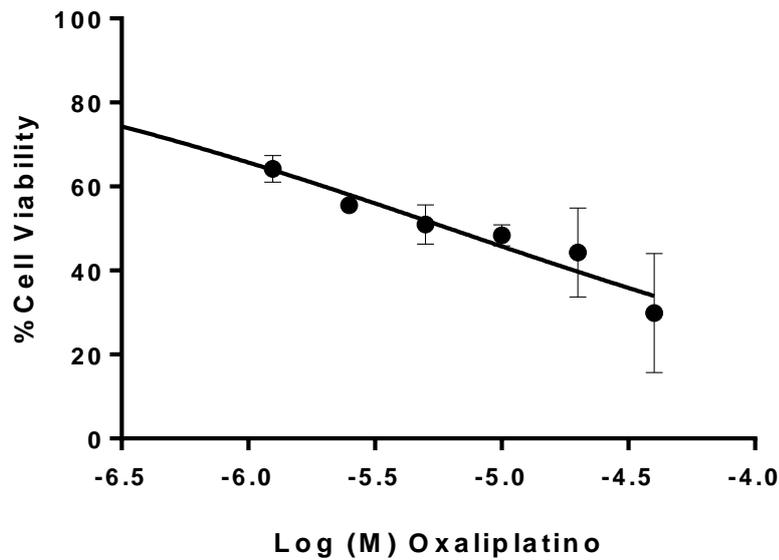
4.2.3. Respuesta a oxaliplatino

Con oxaliplatino se realizaron 4 experimentos independientes. El número de dosis utilizadas no siempre fue el mismo porque se fueron ajustando según el número de células obtenidas tras cada descongelación. La viabilidad se leyó a las 48 h y a 72 h. Para las 48 h tuvieron que descartarse dos experimentos para los cuales el control presentó valores anómalos, para las 72 h se mantuvieron los cuatro ensayos descartando únicamente un valor puntual en uno de los experimentos.

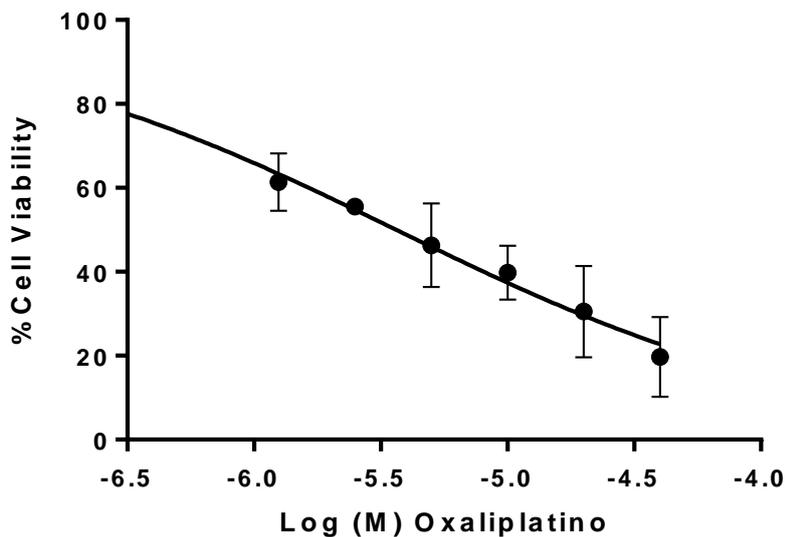
En la Figura 12 A y B se pueden observar los resultados obtenidos representados gráficamente. Con únicamente 1,25 μ M ya presenta una disminución de la viabilidad del 60 % tanto a las 48 h como a las 72 h. A medida que aumenta la concentración se observa una disminución de la viabilidad hasta alcanzar el 30 % en el caso de las 48 h y un 20 % para las 72 h.

En la Figura 12 C se ven representadas las IC_{50} , es decir, la concentración necesaria para inhibir la mitad de la viabilidad. La IC_{50} a las 72 h es la mitad que la IC_{50} a las 48 h.

A Respuesta a Oxaliplatino: 48 horas



B Respuesta a Oxaliplatino: 72 horas



C

	IC ₅₀ en μM
48h	6,206 \pm 3,02
72h	3,641 \pm 1,29

Figura 12:

Efectos del oxaliplatino sobre la viabilidad de células primarias de MCL. Las células fueron tratadas con dosis crecientes de oxaliplatino: 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 μM durante 24 h (A) y 48 h(B). Los gráficos representan el porcentaje relativo de células viables respecto a las células no tratadas. C) Determinaciones de las IC₅₀ en μM de oxaliplatino para las 48h y las 72h.

Los valores se han obtenido de 2 determinaciones independientes en el caso de las 48 h y de 4 determinaciones independientes en el caso de las 72 h. Todas las lecturas se han realizado por duplicado.

La evolución de los controles de todos los experimentos realizados con MCL se muestran en la Tabla 2. El Ensayo 1 se corresponde con el experimento realizado con gemcitabina y los ensayos del 2 al 5 a los experimentos con oxaliplatino. En cada descongelación, las células siguen un patrón de crecimiento diferente. En los dos primeros ensayos se observa un ligero aumento de la viabilidad a las 24 h seguido de un descenso hasta alcanzar valores parecidos a los del control de las 0 h. En cambio, en los otros experimentos la viabilidad ha empezado a descender ya a partir de las 24 h, volviendo a aumentar en el caso del último ensayo.

	% Viabilidad respecto al Control 0h				
	Ensayo 1 MCL	Ensayo 2 MCL	Ensayo 3 MCL	Ensayo 4 MCL	Ensayo 5 MCL
0 h	100	100	100	100	100
24h	143,5	296,1	73,6	67,7	80,9
48h	116,9	151,2	---	---	136,4
72h	---	109,5	31,4	53,2	105,1

Tabla 2: Porcentajes de viabilidad a las 24 h, 48 h y 72 h respecto al valor a las 0 h de tratamiento de dos de los experimentos realizados con las líneas primarias de MCL.

5. Discusión

No se habían realizado estudios del efecto de la trifluoperazina sobre neoplasias hematológicas anteriormente según la revisión de la bibliografía. El objetivo de los ensayos realizados con Jurkat (Fig.10) era principalmente adquirir la practica necesaria para trabajar con células en suspensión y la realización de ensayos de quimiosensibilidad, utilizando una línea celular antes de empezar con los cultivos primarios. Por ello no se realizaron más repeticiones ni se pudo calcular la IC_{50} . Igualmente, los resultados son innovadores y parecen prometedores, por lo que podría ser interesante realizar más ensayos en estudios posteriores con tal de comprobar su reproducibilidad.

Respecto a los ensayos realizados con el paciente de AML se podría atribuir la falta de correlación entre la dosis y la respuesta a los fármacos al mal estado de las células. Disminuye mucho la viabilidad a lo largo del tiempo y no se ha considerado adecuado tomar como referencia un control que se encuentra a menos de un 15 % de viabilidad respecto las 0 h. Por ello, se descartaron los resultados obtenidos en todos los experimentos realizados con este paciente. Según la bibliografía consultada, no se habían reportado problemas de viabilidad de las células primarias de AML en los ensayos de quimiosensibilidad descritos,²⁹ por lo tanto probablemente sea debido a un problema puntual con las células de este paciente.

Observando la respuesta a oxaliplatino en las células del paciente de MCL, se observa que tanto a las 48h como a las 72h existe una buena respuesta dependiente de la dosis, por lo que no permite discriminar una metodología frente a la otra. Era de esperar que a las 72h la IC_{50} disminuyera con respecto a la IC_{50} obtenida a las 48h, visto que a mayor tiempo pasado en contacto con el fármaco más efecto tiene, así que puede inhibir el 50 % de la viabilidad con una menor concentración (Fig. 12C).

Se destaca el error elevado tanto a las 48 h como a las 72 h, sin embargo, el objetivo del trabajo no era determinar con exactitud las IC_{50} sino el rango en el que se encuentran para poder compararlo con los rangos en plasma. Las IC_{50} obtenidas se encuentran en rangos de micromolar y las concentraciones en plasma son de entre $3,6 \mu M^{50}$ y $4,8 \mu M^{51}$ en perfusiones de 85 mg/m^2 y de entre $5.9 \mu M^{52}$ y $9,1 \mu M^{51}$ en perfusiones de 130 mg/m^2 . El paciente estudiado fue tratado con una perfusión de 100 mg/m^2 . Por lo tanto, se puede afirmar que el paciente es sensible a este fármaco, coincidiendo con su remisión completa con el régimen GEMOX-R.

Por otro lado parece que los linfoblastos extraídos de este paciente no son sensibles a gemcitabina (Fig 11), esto concuerda con los resultados obtenidos por el grupo de investigación en el que se demostró que el oxaliplatino era el fármaco más efectivo de este

régimen.²⁸ Por otra parte las concentraciones plasmáticas obtenidas en los pacientes tratados con perfusiones de 1000 mg/m² de gemcitabina, como las que fueron administradas a este paciente, son de 32 µM⁵³. Por ello, sería de interés tratar células primarias con concentraciones más elevadas de este fármaco con tal de evaluar la respuesta en esas condiciones.

Analizando todos los experimentos con las células primarias de MCL conjuntamente se destaca la gran variabilidad del comportamiento de las células tras cada descongelación, poniendo en evidencia la necesidad de realizar más pruebas para optimizar el método.

Además, sería imprescindible seguir realizando esta clase de pruebas con un mayor número de pacientes antes de poder afirmar si los resultados tienen un valor predictivo. Como ya se ha comentado, en estudios anteriores, no se llegó a afirmar que el estudio tuviese valor predictivo incluso con más de 80 pacientes, considerando que el número de pacientes estudiados no era lo suficientemente grande.³³ Esto pone de manifiesto la imposibilidad de generalizar los resultados obtenidos con únicamente un paciente de cada una de las enfermedades estudiadas.

6. Conclusiones

1. Sería de interés estudiar la respuesta de neoplasias hematológicas a trifluoperazina.
2. Las células del paciente de MCL no responden a gemcitabina en el rango de dosis utilizado. Sería por tanto de interés continuar los estudios utilizando concentraciones más elevadas.
3. Las células del paciente de MCL presentan una IC₅₀ en el rango de las concentraciones plasmáticas obtenidas en los pacientes tratados con oxaliplatino, lo cual indica que los ensayos de quimiosensibilidad *ex vivo* reproducen los efectos obtenidos *in vivo*.
4. La variabilidad en el comportamiento del control tras cada descongelación pone de manifiesto la necesidad de realizar más ensayos para poner a punto la técnica y estimar el valor predictivo de esta clase de ensayos.

7. Bibliografía

1. Davis AS, Viera AJ, Mead MD. Leukemia: an overview for primary care. *Am Fam Physician*. 2014;89(9):731-738. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24784336>. Accessed May 4, 2018.
2. John Walter. Leucemia mieloide aguda. *Fight blood cancers Leuk → Lymphoma* . https://www.lls.org/sites/default/files/file_assets/sp_aml.pdf. Accessed March 12, 2018.
3. Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005;106(4):1154-1163. doi:10.1182/blood-2005-01-0178
4. CITARABINA EN VADEMECUM IQB. <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/c084.htm>. Accessed November 6, 2017.
5. Lamba JK. Genetic factors influencing cytarabine therapy. *Pharmacogenomics*. 2009;10(10):1657-1674. doi:10.2217/pgs.09.118
6. Piska K, Koczurkiewicz P, Bucki A, Wójcik-Pszczola K, Kołaczkowski M, Pękala E. Metabolic carbonyl reduction of anthracyclines - role in cardiotoxicity and cancer resistance. Reducing enzymes as putative targets for novel cardioprotective and chemosensitizing agents. *Invest New Drugs*. 2017;35(3):375-385. doi:10.1007/s10637-017-0443-2
7. Guano F, Pourquier P, Tinelli S, et al. Topoisomerase poisoning activity of novel disaccharide anthracyclines. *Mol Pharmacol*. 1999;56(1):77-84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10385686>. Accessed April 29, 2018.
8. Hollingshead LM, Faulds D. Idarubicin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in the chemotherapy of cancer. *Drugs*. 1991;42(4):690-719. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1723369>. Accessed April 30, 2018.
9. Lowinger TB, Riedl B, Dumas J, Smith RA. Design and discovery of small molecules targeting raf-1 kinase. *Curr Pharm Des*. 2002;8(25):2269-2278. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12369855>. Accessed April 30, 2018.
10. Ravandi F, Cortes JE, Jones D, et al. Phase I/II study of combination therapy with sorafenib, idarubicin, and cytarabine in younger patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2010;28(11):1856-1862. doi:10.1200/JCO.2009.25.4888
11. Hu S, Niu H, Inaba H, et al. Activity of the Multikinase Inhibitor Sorafenib in Combination With Cytarabine in Acute Myeloid Leukemia. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2011;103(11):893-905. doi:10.1093/jnci/djr107
12. Zhang W, Konopleva M, Shi Y, et al. Mutant FLT3: A Direct Target of Sorafenib in Acute Myelogenous Leukemia. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2008;100(3):184-198. doi:10.1093/jnci/djm328
13. Campo E, Chott A, Kinney MC, et al. Update on extranodal lymphomas. Conclusions of the Workshop held by the EAHP and the SH in Thessaloniki, Greece. *Histopathology*. 2006;48(5):481-504. doi:10.1111/j.1365-2559.2006.02369.x

14. Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet*. 2012;380(9844):848-857. doi:10.1016/S0140-6736(12)60605-9
15. Navarro A, Royo C, Hernández L, Jares P, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: new perspectives and challenges with clinical implications. *Semin Hematol*. 2011;48(3):155-165. doi:10.1053/j.seminhematol.2011.04.001
16. Campo, E., Raffeld, M. & Jaffe ES. Mantle Cell Lymphoma. *Semin Hematol* 36, 115–127. 1999.
<http://www.uscapknowledgehub.org/site~/102nd/pdf/companion22h05.pdf>. Accessed May 3, 2018.
17. Ghielmini M, Zucca E. How I treat mantle cell lymphoma. *Blood*. 2009;114(8):1469-1476. doi:10.1182/blood-2009-02-179739
18. Herrmann A, Hoster E, Zwingers T, et al. Improvement of overall survival in advanced stage mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2009;27(4):511-518. doi:10.1200/JCO.2008.16.8435
19. Inwards DJ, Witzig TE. Initial therapy of mantle cell lymphoma. *Ther Adv Hematol*. 2011;2(6):381-392. doi:10.1177/2040620711412418
20. Dreyling M, Lenz G, Hoster E, et al. Early consolidation by myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly prolongs progression-free survival in mantle-cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the European MCL Network. *Blood*. 2005;105(7):2677-2684. doi:10.1182/blood-2004-10-3883
21. Obrador-Hevia A, Mattos SF de, Villalonga P, Rodríguez J. Molecular biology of mantle cell lymphoma: From profiling studies to new therapeutic strategies. *Blood Rev*. 2009;23(5):205-216. doi:10.1016/j.blre.2009.03.001
22. Arango D, Wilson AJ, Shi Q, et al. Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Br J Cancer*. 2004;91(11):1931-1946. doi:10.1038/sj.bjc.6602215
23. de Sousa Cavalcante L, Monteiro G. Gemcitabine: Metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. *Eur J Pharmacol*. 2014;741:8-16. doi:10.1016/J.EJPHAR.2014.07.041
24. El Gnaoui T, Dupuis J, Belhadj K, et al. Rituximab, gemcitabine and oxaliplatin: an effective salvage regimen for patients with relapsed or refractory B-cell lymphoma not candidates for high-dose therapy. *Ann Oncol*. 2007;18(8):1363-1368. doi:10.1093/annonc/mdm133
25. Coiffier B, Lepage E, Brière J, et al. CHOP Chemotherapy plus Rituximab Compared with CHOP Alone in Elderly Patients with Diffuse Large-B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346(4):235-242. doi:10.1056/NEJMoa011795
26. López A, Gutiérrez A, Palacios A, et al. GEMOX-R regimen is a highly effective salvage regimen in patients with refractory/relapsing diffuse large-cell lymphoma: a phase II study. *Eur J Haematol*. 2007;80(2):127-132. doi:10.1111/j.1600-0609.2007.00996.x

27. Rodríguez J, Gutierrez A, Palacios A, et al. Rituximab, gemcitabine and oxaliplatin: An effective regimen in patients with refractory and relapsing mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2007;48(11):2172-2178. doi:10.1080/10428190701618268
28. Obrador-Hevia A, Serra-Sitjar M, Rodríguez J, et al. Efficacy of the GemOx-R regimen leads to the identification of Oxaliplatin as a highly effective drug against Mantle Cell Lymphoma. *Br J Haematol*. 2016;174(6):899-910. doi:10.1111/bjh.14141
29. Hayon T, Dvilansky A, Shpilberg O, Nathan I. Leukemia & Lymphoma Appraisal of the MTT-based Assay as a Useful Tool for Predicting Drug Chemosensitivity in Leukemia Appraisal of the MTT-based Assay as a Useful Tool for Predicting Drug Chemosensitivity in Leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2003;44(11):1957-1962. doi:10.1080/1042819031000116607
30. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1112-1116. doi:10.1038/nprot.2006.179
31. Unger FT, Witte I, David KA. Prediction of individual response to anticancer therapy: historical and future perspectives. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(4):729-757. doi:10.1007/s00018-014-1772-3
32. Kurbacher CM, Cree IA, Bruckner HW, et al. Use of an ex vivo ATP luminescence assay to direct chemotherapy for recurrent ovarian cancer. *Anticancer Drugs*. 1998;9(1):51-57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9491792>. Accessed April 30, 2018.
33. Nørgaard JM, Langkjer ST, Palshof T, Pedersen B, Hokland P. Pretreatment leukaemia cell drug resistance is correlated to clinical outcome in acute myeloid leukaemia. *Eur J Haematol*. 2001;66(3):160-167. doi:10.1034/j.1600-0609.2001.00361.x
34. Silber R, Degar B, Costin D, et al. Chemosensitivity of lymphocytes from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia to chlorambucil, fludarabine, and camptothecin analogs. *Blood*. 1994;84(10):3440-3446. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7949099>. Accessed March 8, 2018.
35. Bosanquet AG, Johnson SA, Richards SM. Prognosis for fludarabine therapy of chronic lymphocytic leukaemia based on ex vivo drug response by DiSC assay. *Br J Haematol*. 1999;106(1):71-77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10444165>. Accessed May 23, 2018.
36. Nørgaard JM, Olesen G, Kristensen JS, Pedersen B, Hokland P. Leukaemia cell drug resistance and prognostic factors in AML. *Eur J Haematol*. 1999;63(4):219-224. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10530409>. Accessed April 30, 2018.
37. Abraham A, Varatharajan S, Karathedath S, et al. RNA expression of genes involved in cytarabine metabolism and transport predicts cytarabine response in acute myeloid leukemia. *Pharmacogenomics*. 2015;16(8):877-890. doi:10.2217/pgs.15.44
38. Abraham RT, Weiss A. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(4):301-308. doi:10.1038/nri1330
39. Jurkat (T-Cell Leukemia, TIB-152) | Altogen Biosystems: Transfection Reagents for

- Cell Lines and In Vivo Tissue Delivery. <https://altogen.com/product/jurkat-electroporation-kit-t-cell-leukemia-tib-152/>. Accessed June 7, 2018.
40. Biomodel: Complementos de Bioquímica y Biología Molecular. <http://biomodel.uah.es/inicio.htm>. Accessed June 9, 2018.
 41. Hidalgo RB, Sheehan D V. Generalized anxiety disorder. *Handb Clin Neurol*. 2012;106:343-362. doi:10.1016/B978-0-444-52002-9.00019-X
 42. Pinheiro T, Otrocka M, Seashore-Ludlow B, et al. A chemical screen identifies trifluoperazine as an inhibitor of glioblastoma growth. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;494(3-4):477-483. doi:10.1016/j.bbrc.2017.10.106
 43. Plunkett W, Liliemark JO, Estey E, Keating MJ. Saturation of ara-CTP accumulation during high-dose ara-C therapy: pharmacologic rationale for intermediate-dose ara-C. *Semin Oncol*. 1987;14(2 Suppl 1):159-166. doi:10.5555/URI:PII:0093775487900613
 44. Zhang W, Konopleva M, Ruvolo VR, et al. Sorafenib induces apoptosis of AML cells via Bim-mediated activation of the intrinsic apoptotic pathway. *Leukemia*. 2008;22(4):808-818. doi:10.1038/sj.leu.2405098
 45. Auclair D, Miller D, Yatsula V, et al. Antitumor activity of sorafenib in FLT3-driven leukemic cells. *Leukemia*. 2007;21(3):439-445. doi:10.1038/sj.leu.2404508
 46. Hu S, Niu H, Minkin P, et al. Comparison of antitumor effects of multitargeted tyrosine kinase inhibitors in acute myelogenous leukemia. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(5):1110-1120. doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-2218
 47. Ravandi F, Alattar ML, Grunwald MR, et al. Phase 2 study of azacytidine plus sorafenib in patients with acute myeloid leukemia and FLT-3 internal tandem duplication mutation. *Blood*. 2013;121(23):4655-4662. doi:10.1182/blood-2013-01-480228
 48. Li K, Hu C, Mei C, et al. Sequential combination of decitabine and idarubicin synergistically enhances anti-leukemia effect followed by demethylating Wnt pathway inhibitor promoters and downregulating Wnt pathway nuclear target. *J Transl Med*. 2014;12:167. doi:10.1186/1479-5876-12-167
 49. Reid JM, Pendergrass TW, Krailo MD, Hammond GD, Ames MM. Plasma pharmacokinetics and cerebrospinal fluid concentrations of idarubicin and idarubicinol in pediatric leukemia patients: a Childrens Cancer Study Group report. *Cancer Res*. 1990;50(20):6525-6528. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2208112>. Accessed February 15, 2018.
 50. Ehrsson H, Wallin I, Yachnin J. Pharmacokinetics of Oxaliplatin in Humans. *Med Oncol*. 2002;19(4):261-266. doi:10.1385/MO:19:4:261
 51. Graham MA, Lockwood GF, Greenslade D, Brienza S, Bayssas M, Gamelin E. Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. *Clin Cancer Res*. 2000;6(4):1205-1218. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10778943>. Accessed June 10, 2018.

52. Burz C, Str R, Berindan-Neagoe I, et al. Clinical and Pharmacokinetics Study of Oxaliplatin in Colon Cancer Patients. *J Gastrointestin Liver Dis March*. 2009;18(1):39-43. <http://www.jgld.ro/2009/1/6.pdf>. Accessed June 10, 2018.
53. Ciccolini J, Serdjebi C, Peters GJ, Giovannetti E. Pharmacokinetics and pharmacogenetics of Gemcitabine as a mainstay in adult and pediatric oncology: an EORTC-PAMM perspective. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016;78(1):1-12. doi:10.1007/s00280-016-3003-0