



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 333 669**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06727336 .7**

(96) Fecha de presentación : **20.03.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1861713**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **05.12.2007**

(54) Título: **Procedimiento de cribado de trazadores de PET para la supervisión precoz de la terapia del cáncer.**

(30) Prioridad: **21.03.2005 US 663818 P**
22.09.2005 US 719726 P
14.03.2006 US 782261 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.02.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.02.2010

(73) Titular/es: **GE Healthcare Limited**
Amersham Place
Little Chalfont, Buckinghamshire HP7 9NA, GB

(72) Inventor/es: **Bergstrom, Mats;**
Razifar, Pasha;
Monnazzam, Azita;
Lindhe, Orjan;
Awad, Raymond;
Langstrom, Bengt;
Josephsson, Raymond y
Blomqvist, Carl

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de cribado de trazadores de PET para la supervisión precoz de terapia del cáncer.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para la exploración de trazadores de PET en la supervisión precoz de terapia de cáncer. Más específicamente, la invención se refiere a un procedimiento para usar el modelo de esferoide de tumor multicelular (MTS) de cribado de trazadores de PET aplicando la metodología de diseño de experimento (DOE). Se proporciona un procedimiento de determinación de tamaño semi-automatizado (SASDM) 10 novedoso para correlacionar de forma exacta la captación de trazador de PET con el tamaño de los MTS.

Antecedentes de la invención

La tomografía de emisión de positrones (PET) es una técnica de formación de imágenes no invasiva multi-propósito con una amplia variedad de aplicaciones tanto *in vivo* como *in vitro*. La PET ha demostrado eficacia para controlar la respuesta terapéutica en una amplia variedad de cánceres. En oncología clínica, la PET se ha usado para el diagnóstico, estadificación y re-estadificación después del tratamiento o la recurrencia de diferentes neoplasias, que incluyen cáncer de mama. El control de la respuesta a terapia usando PET es eficaz debido a que una terapia eficaz conduce a una modificación fisiológica rápida en tumores y con la elección correcta del trazador de PET, esta modificación se puede 20 poner de manifiesto de forma sencilla y se puede aclarar la respuesta terapéutica (Cohade y col., Cancer Journal, 2002, 8(2), págs.119-134).

Con esta información, los médicos pueden modificar rápidamente una terapia menos eficaz, mejorando de este modo los resultados del paciente y reduciendo el coste de tratamiento ineficaz. Hasta ahora, la 2-[¹⁸F]Fluor-2-desoxi-glucosa (FDG) ha sido el trazador de PET más común. La PET con FDG representa una modalidad de formación de imágenes funcional que se basa en las características metabólicas de los tumores malignos (van der Hiel y col., 2001, Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, Suplemento, 127(5), págs. 269-277). La captación de [¹⁸F]FDG en tejidos refleja tanto el transporte como la fosforilación de glucosa por células viables. La evaluación cuantitativa del metabolismo tumoral por PET con [¹⁸F]FDG representa una estrategia novedosa de cribado de la respuesta de tumores malignos a quimioterapia. 30

La evaluación temprana de la respuesta beneficiaría en gran medida el tratamiento de pacientes que reciben quimioterapia garantizando la continuación de la terapia eficaz en los que responden o instituyendo una terapia alternativa en los que no. También sería beneficioso si se pudieran identificar pacientes con tumores que no responden en un estadio mucho más precoz, evitando de este modo el uso de tratamiento ineficaz, tóxico y costoso. Como un instrumento innovador para el control de terapia, la PET proporciona una evaluación más oportuna de la eficacia de terapias específicas, que después ofrecería una alteración significativa en el tratamiento clínico. 35

Sin embargo, la PET con un trazador para la función celular puede no permitir necesariamente una evaluación temprana de la respuesta a tratamiento. Un prerrequisito para esto es que el tratamiento afecte a cascadas bioquímicas que conducen a acciones antitumorales y que la acción registrada por el trazador de PET esté acoplada de algún modo mecanísticamente a estas cascadas. Por ejemplo, la inhibición del crecimiento por alquilación del ADN puede no conducir necesariamente a la inhibición de la captación de [¹⁸F]FDG y fosforilación. Por lo tanto, no es aconsejable 40 comenzar un experimento clínico con un agente antitumoral esperando que se use PET para el control del tratamiento, sin una evaluación inicial de que la PET puede, de hecho, servir para esta tarea.

Como resultado, las futuras aplicaciones de PET implicarán probablemente otros trazadores además de la FDG, para caracterizar mejor la biología tumoral y medir de manera más eficaz la respuesta a terapia (Gambhir, Journal of Clinical Oncology, 2005, 23(8), págs. 1664-1673). Este potencial refinamiento en la caracterización del tumor ayudará a predecir el comportamiento clínico y ajustará la terapia a la biología del tumor y, de este modo, individualizará el tratamiento. Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar un procedimiento de exploración exacto rápido para seleccionar el trazador o los trazadores de PET más eficaces con otros parámetros de bibliotecas de trazadores de PET disponibles. 50

Para controlar la respuesta a tratamiento de cáncer, se desea un modelo adecuado. En investigaciones preclínicas, el sistema de esferoide de tumor multicelular (MTS) ha proporcionado un modelo superior y más pertinente que las monocapas y es menos exigente y más económico que el modelo animal de xenoinjerto. Los MTS representan un nivel de transición entre células que se desarrollan como una monocapa *in vitro* y tumores sólidos en animales experimentales o pacientes (Kunz-Schughart y col., Cell Biology International, 1999, 23(3), págs. 157-161). Se ha confirmado que la citología y la morfología de los esferoides se parece a la de tumores experimentales en ratones y tumores naturales en seres humanos antes de la neovascularización. De hecho, los MTS representan de forma bastante realista el crecimiento y la organización tridimensional de tumores sólidos y, por lo tanto, simulan las interacciones célula-célula y condiciones microambientales encontradas en los tumores (Gati y col., J. Nucl. Med. 1991, 32 (12), págs. 2258-2265). Por ejemplo, los agregados multicelulares desarrollan una necrosis central, similar a la observada en muchos tumores *in vivo*. Por tanto, el modelo de MTS ha obtenido una importancia fundamental en investigaciones orientadas terapéuticamente, como en las áreas de radioterapia, quimioterapia, terapia fotodinámica, radioinmunoterapia e inmunoterapia basada en células y anticuerpos (Gati y col., Eur. J. Cancer, 1990, 26(7), págs. 802-7). Aboage y col, Anti- 55

Cancer Drug Desting (1998), 13, 703-730 describe el uso de MTS como un modelo pre-clínico para demostrar que un 2-nitroimidazol fluorado es una sonda para hipoxia de tumor.

La determinación del tamaño y la evaluación del patrón de crecimiento son dos aspectos esenciales cuando se estudian las características y el comportamiento de los MTS. Estos son factores importantes en estudios en los que, por ejemplo, se evalúa la captación total de radiotrazadores y en investigaciones orientadas terapéuticamente, cuando un fármaco puede inducir cambios morfológicos en los tumores.

Una de las técnicas usadas más comúnmente para la determinación de tamaño de MTS es medir dos diámetros del esferoide, usando un micrómetro ocular calibrado en un microscopio invertido. Después, estos valores se usan para determinar aproximadamente el volumen. Esta medición requiere tiempo y es imprecisa, especialmente en el caso de MTS irregulares. Además, los MTS tienden a desarrollar una necrosis central, lo que significa que el volumen de células viables es bastante diferente del volumen total del agregado. Por lo tanto, es necesario tener la posibilidad de evaluar el volumen de células viables como una entidad que describe el agregado y la fracción del volumen total constituida por células viables como otra entidad.

Para exactitud y precisión adicional, existe una necesidad de un procedimiento exacto para correlacionar la captación de trazador de PET con el tamaño de los MTS. Esta combinación proporciona una posibilidad para evaluar rápidamente, e *in vitro*, un buen perfil preclínico de fármacos anticancerosos existentes y recién desarrollados.

El análisis o la citación de una referencia en este documento no se comprenderá como una admisión de que tal referencia es técnica anterior a la presente invención.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para la exploración de trazadores de PET en la supervisión precoz de terapia de cáncer, que comprende:

- (a) proporcionar cultivos de esferoides de tumor multicelulares (MTS),
- (b) tratar dichos cultivos de MTS con agente o agentes anticancerosos a una concentración predeterminada durante un tiempo de tratamiento predeterminado,
- (c) determinar los volúmenes viables de los MTS,
- (d) incubar los MTS con trazadores de PET de interés durante un periodo de tiempo predeterminado,
- (e) medir la captación total de trazador de PET para cada tratamiento de los MTS y
- (f) analizar los datos de la captación de trazador de PET por unidad de volumen viable de los MTS y determinar el trazador o trazadores de PET adecuados para cada agente anticanceroso.

En una realización preferida de la presente invención, el procedimiento usa la metodología de diseño de experimento (DOE) para diseñar el experimento y analizar datos.

En otra realización preferida de la presente invención, los volúmenes viables de los MTS se determinan por el procedimiento de determinación de tamaño semi-automatizado (SASDM), que comprende:

- (a) formar imágenes de un objeto de referencia,
- (b) formar imágenes de MTS,
- (c) calcular el volumen viable de MTS basándose en el área total visualizada de MTS, área visualizada de necrosis de MTS, área total visualizada del objeto de referencia y área total conocida del objeto de referencia.

Serán evidentes otras características y ventajas de la presente invención a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, se debe entender que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se proporcionan solamente a modo de ilustración.

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1a y 1b muestran el coeficiente significativo del tratamiento con Paclitaxel y la respuesta predicha medida por cada trazador después del tratamiento con Paclitaxel.

Las Figuras 2a y 2b muestran el coeficiente significativo del tratamiento con Docetaxel y la respuesta predicha medida por cada trazador después del tratamiento con Docetaxel.

ES 2 333 669 T3

Las Figuras 3a y 3b muestran el coeficiente significativo del tratamiento con Doxorubicina y la respuesta predicha medida por cada trazador después del tratamiento con Doxorubicina.

5 Las Figuras 4a y 4b muestran el coeficiente significativo del tratamiento con Tamoxifeno y la respuesta predicha medida por cada trazador después del tratamiento con Tamoxifeno.

Las Figuras 5a y 5b muestran el coeficiente significativo del tratamiento con Imatinib y la respuesta predicha medida por cada trazador después del tratamiento con Imatinib.

10 La Figura 6 muestra el cambio del volumen viable de MTS con y sin 1 μ M de cada tratamiento anticanceroso.

La Figura 7 muestra el cambio del volumen viable de MTS con y sin 10 μ M de cada tratamiento anticanceroso.

15 La Figura 8 muestra Experimento de competición (izquierda superior) Dependencia de temperatura de la captación de [18 F]FDG (derecha superior) Experimento de inhibición (izquierda inferior) Dependencia de insulina del transporte de glucosa (derecha inferior).

Las Figuras 9a y 9b muestran el efecto de Paclitaxel en esferoides de tumor multicelulares de MCF-7 y BT474.

20 Las Figuras 10a y 10b muestran el efecto de Docetaxel en esferoides de tumor multicelulares de MCF-7 y BT474.

Las Figuras 11a y 11b muestran el efecto de Doxorubicina en esferoides de tumor multicelulares de MCF-7 y BT474.

25 Las Figuras 12a y 12b muestran el efecto de Tamoxifeno en esferoides de tumor multicelulares de MCF-7 y BT474.

Las Figuras 13a y 13b muestran el efecto de Imatinib en esferoides de tumor multicelulares de MCF-7 y BT474.

30 La Figura 14 ilustra un procedimiento para usar el modelo de MTS para observar los efectos del tratamiento de quimioterapia sobre el crecimiento celular por PET con FDG.

La Figura 15 es un objeto de referencia usado para la calibración absoluta de área. Las unidades sobre el eje son números de píxeles.

35 La Figura 16 muestra imágenes de agregados celulares de MCF-7. Se han dibujado ROI que separan la necrosis y la parte viva del fondo. Las unidades en el eje son números de píxeles.

La Figura 17 muestra el patrón de crecimiento del volumen para el MTS de la línea celular MCF-7 durante 17 días de observación. Los datos representan la media de 24 MTS.

40 La Figura 18 muestra imágenes de seis MTS de U-343 diferentes. Se han dibujado ROI que separan la necrosis y la parte viva del fondo.

45 La Figura 19 muestra el patrón de crecimiento de volumen para el MTS de la línea celular U-343 durante 15 días de observación. Los datos representan la media de 24 MTS.

La Figura 20 muestra imágenes de agregados de células BON. Se han dibujado ROI que separan la necrosis y la parte viva del fondo.

50 La Figura 21 muestra el patrón de crecimiento de volumen para el MTS de la línea celular BON durante 17 días de observación. Los datos representan la media de 24 MTS.

La Figura 22 muestra una autorradiografía de sección congelada de un MTS de MCF-7 incubado con 18 F-FDG.

55 La Figura 23 muestra la tinción con Hematoxilina y Eosina de una sección de MTS de BON. Se observa un foco de necrosis en la parte central del dibujo.

Descripción detallada de la invención

60 El procedimiento de la presente invención proporciona un procedimiento rápido y exacto de cribado de trazadores de PET para la supervisión precoz de terapia de cáncer (por ejemplo, cáncer de mama). Usa un sistema de esferoide de tumor multicelular (MTS) que proporciona un modelo superior y más pertinente a las monocapas y es menos exigente y más económico que el modelo animal de xenoinjerto. La combinación de formación de imágenes morfológica y evaluación de condición metabólica de tumor usada en el procedimiento de la presente invención mejora el conocimiento cuantitativo con respecto al tumor y la respuesta al tratamiento.

El procedimiento comprende las siguientes etapas:

- (a) proporcionar cultivos de esferoides de tumor multicelulares (MTS),
- (b) tratar dichos cultivos de MTS con un agente o agentes anticancerosos a una concentración predeterminada durante un tiempo de tratamiento predeterminado,
- (c) determinar los volúmenes viables de los MTS,
- (d) incubar los MTS con trazadores de PET de interés durante un periodo de tiempo predeterminado,
- (e) medir la captación total de trazador de PET para cada tratamiento de los MTS y
- (f) analizar los datos de la captación de trazador de PET por unidad de volumen viable de los MTS y determinar el trazador de PET adecuado para cada agente anticanceroso.

En una realización preferida de la presente invención, el procedimiento usa la metodología de diseño de experimento (DOE) para diseñar el experimento y analizar datos.

1. Diseño de Experimento: en una realización preferida de la invención, el procedimiento comienza con un diseño de experimento que usa un paquete de DOE comercial (por ejemplo, MODDE). Basándose en experimentos específicos, se pueden definir varios factores. Los factores típicos son: agentes anticancerosos, dosis, trazadores de PET y tiempo de tratamiento. También se define una respuesta, por ejemplo, captación de trazador/volumen viable (de cada MTS). Después, el diseño de experimento se puede completar seleccionando el modelo y diseño más apropiado.
2. Esferoide de tumor multicelular (MTS): las células tumorales se tripsinizan del cultivo de monocapa madre. Después, las suspensiones celulares se siembran en placas de cultivo de 24 pocillos, revestidas con agarosa al 1%, con aproximadamente 10.000-50.000 células por pocillo. Los cultivos se mantienen a 37°C con CO₂ al 5% y se cultivan durante aproximadamente cinco días.
3. Tratamiento anticanceroso: el agente o los agentes anticancerosos se diluyen en el medio de cultivo de desarrollo hasta una concentración predeterminada (de DOE). El tratamiento comienza el último día del crecimiento de MTS con cambio del medio de cultivo al medio que contiene agente anticanceroso. El medio se renueva después de una hora. En cada ajuste experimental, cuatro MTS en una placa de 24 pocillos se denominan un grupo. Cada grupo incluye un control (sin agente anticanceroso) y diferentes concentraciones del agente anticanceroso. El tiempo de tratamiento se predetermina por el DOE.
4. Análisis de imágenes y determinación del tamaño de los MTS: las imágenes de los MTS se registran por una cámara (por ejemplo, una cámara Nikon Colorpix 4500 montada en un microscopio invertido Zeiss) antes de la incubación con trazador de PET. Se forman las imágenes de un objeto de referencia de un modo similar sin cambiar ningún ajuste de cámara. Los datos adquiridos se analizan por el procedimiento de determinación de tamaño semi-automatizado (SASDM).

La determinación del tamaño y la evaluación del patrón del crecimiento son dos aspectos esenciales cuando se estudian las características y el comportamiento de los MTS. Estos son factores importantes en estudios en los que, por ejemplo, se evalúa la captación total de radiotrazadores y en investigaciones orientadas terapéuticamente, donde un fármaco puede inducir cambios morfológicos en los tumores.

Una de las técnicas usadas más comúnmente para la determinación de tamaño de MTS es medir dos diámetros del esferoide, usando un micrómetro ocular calibrado en un microscopio invertido. Después, estos valores se usan para determinar aproximadamente el volumen. Esta medición requiere tiempo y es imprecisa, especialmente en el caso de MTS irregulares. Adicionalmente, los MTS tienden a desarrollar una necrosis central, lo que significa que el volumen de células viables es bastante diferente del volumen total del agregado. Por lo tanto, es necesario tener la posibilidad de evaluar el volumen de células viables como una entidad que describe el agregado y la fracción del volumen total constituida por células viables como otra entidad.

En la presente invención, se proporciona un procedimiento eficaz, rápido y semi-automatizado (SASDM) para la determinación más exacta del tamaño de los MTS y su fracción de células viables se ha desarrollado y utilizado.

Se desarrolló un programa de software en Matlab (The Mathworks, Natick, Massachusetts) con una interfaz fácil para el usuario para realizar el análisis de imágenes usando rutinas de las herramientas “procesamiento de imágenes”.

El software describe automáticamente una ROI (Región de Interés) que distingue el área de necrosis del área en la que las células todavía están vivas y una ROI alrededor de todo el MTS. Esto se realiza automática y secuencialmente para todas las imágenes. El área total del MTS y el área total de necrosis se calculan como el número total de píxeles

dentro de las ROI y se convierte en μm^2 usando el radio del objeto de referencia. Para el cálculo del volumen del MTS se usa la siguiente ecuación:

$$V = \frac{4}{3} \pi r^3$$

En la que $r = \sqrt{\text{área}/\pi}$ se usa para el cálculo del radio de la esfera. El volumen total de la necrosis se calcula y se resta del volumen total del MTS para obtener el volumen total de la parte viva. Adicionalmente se calcula la fracción de volumen total constituida por células vivas.

Todas las imágenes con ROI descritas que distinguen las diferentes partes de los MTS se visualizan y se guardan automáticamente como archivos TIFF (Formato de Archivo de Imagen con Etiquetas) para observaciones adicionales. Todas las mediciones estadísticas deseadas incluyendo el volumen total de todos los MTS y el volumen total de la parte de necrosis se guardan en un archivo EXCEL con el nombre de archivo especificado para todo el grupo de MTS.

5. Trazadores de PET: Para controlar el efecto de cada tratamiento anticanceroso, se pueden utilizar varios trazadores de PET establecidos y nuevos. Son ejemplos de trazadores de PET establecidos: $[1-^{11}\text{C}]\text{Acetato}$, $[^{11}\text{C}]\text{Colina}$, $[^{18}\text{F}]\text{3'-Desoxi-3'-fluortimifina}$ y $2-[^{18}\text{F}]\text{Fluor-2-desoxiglucosa}$.

6. Captación de trazador de PET: Los agregados de MTS se incuban durante 30 min (para trazadores marcados con ^{18}F) y 50 min (para trazadores marcados con ^{11}C) a 37°C con, por ejemplo, 0,5 ml de medio por pocillo que contiene 3 MBq de trazador y después se lavan 3x5 min (para trazadores marcados con ^{18}F) y 3x3 min (para trazadores marcados con ^{11}C) con medio (1 ml/pocillo). Finalmente, los MTS con medio de lavado se transfieren a tubos y se evalúa la captación de trazador en un γ -contador de pocillo calibrado. A continuación, un volumen de medio de incubación se mide como referencia y un volumen idéntico del último medio de lavado se mide como control de fondo.

La captación de trazador en MTS se define como:

$$\text{Captación de trazador} = (\text{Conc. act. (Bq/ml) de MTS}) / (\text{Conc. act (Bq/ml) de referencia}).$$

La respuesta a cada tratamiento anticanceroso se evalúa por medición de la captación de trazador y volumen viable de los MTS.

7. Análisis de datos: Para cada experimento, la captación de trazador y la captación de trazador/volumen viable de MTS se normalizan para el grupo de control. Todos los datos se analizan en un programa de DOE (por ejemplo, MODDE). El análisis puede usar factores y respuestas predefinidos. El ajuste experimental puede ser, por ejemplo, diseño factorial completo y el modelo se puede calcular con regresión múltiple.

El modelo se puede refinar por: 1. eliminación de valores atípicos malos (valores atípicos para todas las respuestas); 2. eliminación/adición de términos del/al modelo que son insignificativos/significativos para todas las respuestas; y 3. revisión del ajuste y el diagnóstico. Finalmente, se genera un gráfico de coeficiente para identificar los factores importantes, a saber, el trazador o los trazadores de PET más sensibles.

Ejemplos

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos que no tienen por objeto de ningún modo limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Exploración de Trazadores de PET para Controlar la Respuesta Temprana de Quimioterapia en Cáncer de Mama

En el presente estudio se han explorado $[1-^{11}\text{C}]\text{Acetato}$ (ACE), $[^{11}\text{C}]\text{Colina}$ (CHO), $[^{11}\text{C}]\text{Metionina}$ (MET), $[^{18}\text{F}]\text{3'-Desoxi-3'-fluor-timifina}$ (FLT) y $2-[^{18}\text{F}]\text{Fluor-2-desoxiglucosa}$ (FDG) para controlar el efecto de cinco agentes quimioterapéuticos usados rutinariamente en cáncer de mama.

Materiales y Procedimientos

1. Cultivo Celular

Se cultivaron células de la línea de cáncer de mama humano MCF-7 (Colección Europea de Cultivo Celular) en MEM/EBSS complementado con FCS al 10%, piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales al 1% y penicilina al 5% (Tamro). El medio se cambió dos veces por semana y las células se mantuvieron en fase de crecimiento exponencial.

2. Cultivo de Tumor Multicelular

Las células tumorales se tripsinizaron del cultivo en monocapa madre. Después, las suspensiones celulares se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos, revestidas con agarosa al 1%, con aproximadamente 50.000 células por pocillo. Los cultivos se mantuvieron a 37°C con CO₂ al 5% y se cultivaron durante 5 días.

3. Tratamiento Anticanceroso

Los cinco agentes anticancerosos: Paclitaxel, Docetaxel, Doxorrubicina, Tamoxifeno e Imatinib (<http://www.cancer-source.com/drugdb3/>) se diluyeron en el medio de cultivo de desarrollo hasta una concentración de 1 μM y 10 μM. El tratamiento comenzó el día seis del crecimiento de MTS con cambio del medio de cultivo al medio que contenía fármaco. Después de 1 hora, el medio se renovó.

En cada ajuste experimental, cuatro MTS en una placa de 24 pocillos se denominaron un grupo. Los grupos incluían control (sin agente de tratamiento) y cinco tratamientos diferentes con la misma concentración.

La respuesta a cada tratamiento anticanceroso se evaluó por medición de la captación de trazador y el volumen total de los MTS después de 3 y 5 días de tratamiento.

4. Análisis de Imágenes

Se registraron las imágenes de los MTS usando una cámara Nikon Colorpix 4500 montada en un microscopio invertido de Zeiss antes de la incubación con Trazador. Los datos adquiridos se analizaron por SASDM.

5. Trazadores de PET

Para controlar el efecto de cada tratamiento anticanceroso se utilizaron cinco trazadores de PET establecidos; [1-¹¹C]Acetato, [1-¹¹C]Colina, [1-¹¹C]Metionina, [1-¹⁸F]3'-Desoxi-3'-fluortimifina y 2-[¹⁸F]Fluor-2-desoxiglucosa.

6. Captación de Trazador de PET

Los agregados se incubaron durante 30 min (para trazadores marcados con ¹⁸F) y 50 min (para trazadores marcados con ¹¹C) a 37°C con 0,5 ml de medio por pocillo que contenía 3 MBq de trazador y después se lavaron 3x5 min (para trazadores marcados con ¹⁸F) y 3x3 min (para trazadores marcados con ¹¹C) con medio (1 ml/pocillo). Finalmente, los MTS con 20 μl de medio de lavado se transfieren a tubos de 5 ml y se evaluó la captación de Trazador en un γ-contador de pocillo calibrado. A continuación, se midieron 20 μl de medio de incubación como referencia y se midieron 20 μl del último medio de lavado como control de fondo.

La captación de Trazador en MTS se definió como:

$$\text{Captación total} = (\text{Conc. act. (Bq/ml) de MTS}) / (\text{Conc. act (Bq/ml) de referencia}).$$

Cada ajuste experimental se repitió tres veces.

7. Análisis de Datos

Para cada tratamiento, la captación de Trazador y captación de Trazador/volumen de MTS se normalizaron para el grupo de control. Todos los datos se diseñaron y analizaron en MODDE). Los factores se definieron como: Dosis (1 y 10 μM), Tiempo de tratamiento (3 y 5 días) y Trazador (ACE, CHO, MET, FLT y FDG). Las respuestas se definieron como Captación y Captación/volumen. El ajuste experimental se diseñó con Diseño Factorial Completo y el modelo se calculó con Regresión Múltiple.

El Modelo se refinó por:

1. Retirada de valores atípicos malos (valores atípicos para todas las respuestas).
2. Retirada/Adición de términos del/al modelo que eran insignificativos/significativos para todas las respuestas.
3. Revisión del ajuste y el diagnóstico.

Después, para identificar los factores importantes, se generó un gráfico de coeficiente. Este gráfico presenta los coeficientes para la respuesta seleccionada con intervalo de confianza como barras de error.

El ajuste a escala de los datos hace que los coeficientes sean comparables. El tamaño del coeficiente representa el cambio en la respuesta cuando un factor varía de 0 a 1, en unidades codificadas, mientras que los demás factores se mantienen en sus promedios.

Resultados

1. Paclitaxel

Se observó una disminución significativa de la captación de FLT en MTS tratados con Paclitaxel, un inhibidor del remodelado de microtúbulos.

Pero la captación de FDG, ACE, MET y CHO en el mismo grupo fue aproximadamente como en los MTS no tratados. Véase las Figuras 1a y 1b.

2. Docetaxel

La captación de trazadores de PET en MTS tratados con Docetaxel, también un inhibidor del remodelado de microtúbulos, mostró un patrón similar al Paclitaxel. Véase las Figuras 2a y 2b.

3. Doxorrubicina

En MTS tratados con Doxorrubicina, un antibiótico de antraciclina, se detectó una reducción de FLT considerable y una disminución menor de la captación de FDG, ACE, CHO y MET. Véase las Figuras 3a y 3b.

4. Tamoxifeno

Se observó un aumento de la captación de ACE en MTS tratados con Tamoxifeno (un anti-estrógeno). Por otro lado, se observó una disminución de la captación de FLT y MET en el mismo grupo. Véase las Figuras 4a y 4b.

5. Imatinib

El efecto de Imatinib, un inhibidor de proteína tirosina cinasa, sobre los MTS se detectó como disminución de la captación de CHO y aumento de la captación de FLT. Véase las Figuras 5a y 5b.

Discusión

El uso de ACE en la formación de imágenes de tumores se ha sugerido recientemente en neoplasias urológicas. Las posibles rutas bioquímicas de la incorporación o acumulación de acetato incluyen (a) entrada en el ciclo de ácido cítrico de acetil coenzima A (acetil CoA) o como un metabolito intermedio, (b) esterificación para formar acetil CoA como un precursor principal en la β -oxidación para la síntesis de ácidos grasos, (c) combinación con glicina en la síntesis del hemo y (d) por citrato para la síntesis de colesterol. De todas estas posibles rutas metabólicas, se piensa que la participación en la síntesis de ácidos grasos libres (lípidos) es el proceso dominante de incorporación en tumores. Se sugirió que este mecanismo de captación del tumor era diferente del del miocardio, en el que el ACE se dirigió principalmente al ciclo de ácido cítrico. En nuestro estudio se observó un aumento de la captación de ACE como una consecuencia de los cinco tratamientos.

En el cuerpo humano, se necesita colina para la síntesis de fosfolípidos en membranas celulares, metabolismo de metilo, señalización transmembrana y transporte y metabolismo de lípido-colesterol. La colina intracelular se metaboliza rápidamente hasta fosforilcolina (PC); también puede experimentar acetilación para formar acetilcolina u

oxidación para formar betaína (principalmente en el hígado y riñón). La fosforilación está catalizada por la enzima colina cinasa. Una vez fosforilada, la molécula de PC polar queda atrapada dentro de la célula. Diversos estudios han puesto de manifiesto una captación aumentada de colina así como una actividad regulada positivamente de colina cinasa y niveles elevados de PC en células cancerosas. En MTS tratados con Paclitaxel, Docetaxel y Doxorubicina, se detectó un aumento de la captación de CHO, por otro lado, una disminución de la captación de CHO en el tratamiento con Imatinib, un inhibidor de proteína tirosina cinasa.

La MET se ha usado como un agente de formación de imágenes de tumor durante varios años. Su captación refleja un transporte de aminoácidos aumentado y, en parte, síntesis de proteína; también está relacionado con la actividad de proliferación celular. En MTS tratados con Paclitaxel, Docetaxel y Doxorubicina, se detectó un aumento de la captación de MET, por otro lado, una disminución de la captación de MET en el tratamiento con Tamoxifeno.

La FLT ha sido uno de los agentes de PET prometedores que permiten la formación de imágenes con cuantificación *in vivo* de proliferación celular. La FLT se fosforila por timidina cinasa 1 y después queda atrapada intracelularmente entrando en la ruta de recuperación de la síntesis de ADN sin incorporación en la molécula de ADN. La captación de FLT estaba disminuida en relación al tratamiento con Paclitaxel, Docetaxel, Doxorubicina y Tamoxifeno. Se observó un aumento de la captación de FLT en el tratamiento con Imatinib.

En comparación con el otro trazador de PET, FDG, el marcador de transporte de glucosa, no mostró una alta sensibilidad para controlar el efecto de los cinco agentes quimioterapéuticos.

Las Figuras 6 y 7 muestran el cambio del volumen viable de MTS con y sin 1 μM y 10 μM de cada tratamiento anticanceroso, respectivamente.

Conclusión

En tumores tratados con quimioterapia, los cambios metabólicos tienen lugar antes de los cambios anatómicos. Esto quiere decir que la PET puede detectar estos cambios antes de que se puedan observar con otros tipos de formación de imágenes. Pero la cuestión sigue siendo qué modificaciones metabólicas tendrán lugar después de un tratamiento de quimioterapia específico y qué trazador de PET es más sensible para detectar esos cambios particulares.

En nuestro estudio se demostró que para realizar el control de diferentes agentes quimioterapéuticos, pueden ser apropiados diferentes trazadores de PET.

El modelo de MTS es una herramienta preclínica valiosa de cribado de el trazador de PET apropiado o la combinación de trazadores de PET para cada agente o agentes de tratamiento.

El futuro trabajo usando otros trazadores de PET además de FDG ayudará indudablemente a comprender la biología tumoral, mejorar la capacidad de medir y predecir la respuesta y ayudar a ajustar la terapia a pacientes individuales. Los marcadores más específicos de proliferación de células tumorales y expresión génica pueden permitir la aplicación de PET no solamente para el diagnóstico por imagen, sino también para la caracterización biológica no invasiva de tumores malignos y la supervisión precoz de intervenciones terapéuticas.

Esto podría ser útil como una guía para la respuesta temprana a terapia así como proporcionar evaluación funcional de masas residuales de enfermedad. Los marcadores más específicos de proliferación celular, por ejemplo, [^{11}C] timidina o [^{11}C]-aminoácidos pueden proporcionar una información incluso más exacta.

Ejemplo 2

MTS como un Modelo para Evaluación de [^{18}F]FDG como Biomarcador para Control del Tratamiento de Cáncer de Mama

Para explorar un procedimiento pre-clínico para evaluar si [^{18}F]FDG es válida para controlar la respuesta temprana, se usó el modelo de MTS para investigar la captación de FDG en MTS con y sin tratamiento con cinco agentes quimioterapéuticos usados de forma rutinaria en cáncer de mama.

Materiales y Procedimientos

1. Líneas celulares

- a. Se cultivaron células de la línea de cáncer de mama humano MCF-7 (Colección Europea de Cultivo Celular) en MEM/EBSS complementado con FCS al 10%, piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales al 1% y penicilina al 5% (Tamro). El medio se cambió dos veces por semana y las células se mantuvieron en fase de crecimiento exponencial.

- b. Se cultivaron células de la línea de cáncer de mama humano BT474 (Colección Americana de Cultivos Tipo) en DMEM complementado con FCS al 10%, piruvato sódico 1 mM y penicilina al 5% (Tamro). El medio se cambió dos veces por semana y las células se mantuvieron en fase de crecimiento exponencial.

2. Esferoide de tumor multicelular

Las células tumorales se tripsinizaron del cultivo en monocapa madre. Después, las suspensiones celulares se sembraron en placas de esferoide de 24 pocillos, revestidas con agarosa al 1%, con aproximadamente 50.000 células por pocillo para la línea celular MCF-7 y 10.000 células por pocillo para la línea celular BT474. Los esferoides se mantuvieron a 37°C con CO₂ al 5% y se cultivaron durante cinco días.

3. Análisis de imágenes

Las imágenes de los MTS se registraron y analizaron en software de determinación de tamaño semi-automatizado (SASDM). En total se calcularon la necrosis y el volumen viable de cada MTS por el programa.

4. Captación de 2-Fluoro-D-glucosa marcada con ¹⁸F ([¹⁸F]FDG)

Los MTS se incubaron durante 50 min a 37°C con 0,5 ml de medio por pocillo que contenía 3 MBq de [¹⁸F]FDG [21] y después se lavaron 3x5 min con medio (1 ml/pocillo). Finalmente, los MTS con 20 µl de medio de lavado se transfirieron a tubos de 5 ml y se evaluó la captación de [¹⁸F]FDG en un γ-contador de pocillo calibrado. Una muestra de 20 µl del medio de incubación se midió como referencia y 20 µl del último medio de lavado se midieron como control de fondo.

5. Experimentos básicos con [¹⁸F]FDG

Para garantizar la validez fisiológica de la captación de [¹⁸F]FDG en MTS, se realizaron varios experimentos básicos:

- *Dependencia de temperatura de la captación de [¹⁸F]FDG.* Los experimentos de captación de [¹⁸F]FDG se realizaron con dos temperaturas de incubación diferentes: 4°C y 37°C.
- *Experimentos de Competición.* La concentración de glucosa en el medio de cultivo de desarrollo era 5 mM. Para realizar el experimento de competición, se diluyó glucosa adicional no marcada en el medio de cultivo de desarrollo con una concentración de 0 mM (para el grupo de control), 5 mM, 10 mM y 20 mM. El medio de cultivo se sustituyó por medio de cultivo que contenía glucosa/[¹⁸F]FDG. Después de 50 min de incubación, se midió la captación de [¹⁸F]FDG.
- *Experimento de Inhibición.* Los MTS se pre-incubaron con cuatro concentraciones diferentes de un inhibidor del transporte de glucosa, Citocalasina B; 0 µM (para el grupo de control), 10 µM, 25 µM y 50 µM seguido de 50 min de incubación con [¹⁸F]FDG.
- *Captación de [¹⁸F]FDG mediada por insulina.* Los MTS se pre-incubaron con o sin (grupo de control) insulina 10 µM seguido de 50 min de incubación con [¹⁸F]FDG.

Es evidente que los experimentos básicos se realizaron solamente en MTS de la línea celular MCF-7. En cada ajuste experimental, seis MTS en una placa de 24 pocillos se denominaron un grupo y los experimentos se repitieron tres veces.

6. Tratamiento anticanceroso

Los agentes anticancerosos usados fueron:

- Paclitaxel (un inhibidor del remodelado de microtúbulos)
- Docetaxel (también un inhibidor del remodelado de microtúbulos)
- Doxorubicina (un antibiótico de antraciclina)
- Tamoxifeno (un anti-estrógeno)
- Imatinib (un inhibidor de proteína tirosina cinasa).

Cada fármaco se diluyó en el medio de cultivo de desarrollo hasta una concentración de 10 nM, 100 nM y 1 μ M. El tratamiento comenzó el día cinco del crecimiento de MTS con cambio del medio de cultivo al medio que contenía fármaco. Después de 1 h, el medio se renovó y los MTS permanecieron en el medio que contenía fármaco durante 2-3 días.

Para la línea celular MCF-7, cada grupo incluía 6 réplicas y los experimentos se repitieron dos veces.

Para la línea celular BT474, cada grupo incluía 4 réplicas y los experimentos se repitieron tres veces.

La respuesta a cada tratamiento anticanceroso se evaluó mediante medición de la captación de [18 F]FDG y volumen viable de los MTS después de 2 y 3 días de tratamiento.

7. Inmunohistoquímica

γ -H2AX

8. Análisis de datos

La captación de [18 F]FDG por volumen viable de cada MTS se normalizó para el grupo de control. Todos los datos se analizaron por ANOVA y Ensayo de Comparación Múltiple de Dunnett en Graph Pad Prism.

Resultados

Las células tumorales formaron esferoides multicelulares aproximadamente 1 día después de la siembra. El siguiente día se observó la forma redondeada característica con un borde de células viables y una necrosis central.

Cuando se añadió una concentración creciente de glucosa al medio de incubación, la captación de [18 F]FDG en MTS disminuyó gradualmente (Figura 8). La concentración que inducía una reducción del 50% en comparación con el control fue 10 mM. Una temperatura reducida durante la incubación con [18 F]FDG redujo la captación de [18 F]FDG el 77% (ET=6%) (Fig. 8). Estas dos observaciones indican un procedimiento saturable y dependiente de temperatura para la captación de [18 F]FDG y, por tanto, excluye la dominancia por difusión pasiva.

Cuando el inhibidor del transporte de glucosa Citocalasina B se añadió al medio de incubación, la captación de [18 F]FDG disminuyó significativamente; por ejemplo, tuvo lugar una inhibición del 50% a 12 μ M (Fig 8). La adición de insulina al medio de incubación aumentó la captación de [18 F]FDG el 23% (ET=5%) (Fig 8). Estas dos observaciones sugieren que el transporte de glucosa es el mecanismo dominante para la captación de [18 F]FDG en los MTS.

1. Paclitaxel y Docetaxel

Los taxanos redujeron significativamente la captación de [18 F]FDG. La disminución en la captación por volumen viable fue más evidente en BT474 (hasta el 55% de disminución) que en MCF-7 (hasta el 25% de reducción) (Fig. 9a, 9b, 10a y 10b).

2. Doxorubicina

La Doxorubicina, que daña el ADN por intercalación, redujo la captación de [18 F]FDG por volumen viable a la mayor dosis, de forma más evidente en MCF-7 (25%) que en MTS de BT474 (Fig. 11a y 11b).

3. Tamoxifeno

El Tamoxifeno, un compuesto anti-estrógenos, redujo la captación de [18 F]FDG por volumen viable en MCF-7 a la mayor dosis de 1 μ M (Fig. 12a y 12b).

4. Imatinib

El Imatinib, un inhibidor de tirosina cinasa, aumentó ligeramente la captación de [18 F]FDG en MCF-7 a la dosis intermedia de 100 nM y a los dos días de seguimiento, por lo demás no se observó ningún efecto (Fig. 13a y 13b).

Discusión

Para explorar si una variedad de fármacos convencionales anticancerosos afectaría a la captación celular de FDG, se utilizaron esferoides tumorales multicelulares, tratados con los fármacos y después de unos pocos días de tratamiento, se evaluó la captación de FDG. Se seleccionaron dos líneas de células de cáncer de mama diferentes con diferentes características. Las células BT474 tienen el ARNm regulado positivamente y proteína receptora unida a tirosina cinasa HER2/neu en comparación con MCF7, mientras que se conoce que la expresión del receptor de estrógenos alfa está regulada positivamente en células MCF7. Se supone que estas dos líneas celulares son representativas de una diversidad de cánceres de mama.

Aunque cultivar las células como MTS es más trabajoso que en monocapa, las células en MTS imitan más próximamente el entorno biológico real proporcionando adhesión y señalización de célula a célula. Esto proporciona una imagen más pertinente de los efectos del fármaco incluyendo limitaciones en mecanismos de penetración, distribución y retroalimentación en la señalización celular.

En este documento se ha establecido una nueva metodología para la exploración de potenciales fármacos combinando la medición del efecto morfológico del fármaco y la evaluación de la captación del trazador de PET. El procedimiento podría servir a fines dobles: evaluar efectos de nuevos fármacos e identificar el biomarcador de PET óptimo para una evaluación temprana del efecto del fármaco.

Inicialmente se investigó la naturaleza de la captación de [^{18}F]FDG en MTS. Se verificó un metabolismo reducido después de la exposición a baja temperatura o competición con glucosa no marcada o inhibición con Citocalasina B. También se observó un aumento del transporte con adición de insulina. Estos conjuntos de ensayos confirmaron que en MTS de MCF-7, la acumulación de [^{18}F]FDG es un biomarcador que está relacionado con el transporte por los transportadores de glucosa específicos GLUT, seguido de fosforilación por hexocinasa.

Un aspecto importante en la evaluación de quimioterapia por PET-FDG es si [^{18}F]FDG se puede usar como un biomarcador para indicar la respuesta al tratamiento. El criterio aceptado para la respuesta a tratamiento es la reducción en el tamaño del tumor o ausencia verificada de crecimiento adicional. Esto, a su vez, se puede relacionar con una diversidad de aspectos funcionales, tales como inducción de apoptosis, muerte celular directa, efecto sobre vascularidad, proliferación reducida, remodelado de proporciones del tumor y otras células, etc. Estos aspectos no se relacionan necesariamente con los efectos sobre la captación de FDG. Por ejemplo, se ha postulado que un aumento transitorio en la captación de FDG es una indicación de un efecto positivo que provoca una respuesta inflamatoria temporal, llamada metabólica. Un retraso de la proliferación celular se puede asociar con una ausencia de efecto sobre la captación de FDG. Por tanto, es de suma importancia aclarar la relación entre los efectos antitumorales y los efectos sobre la captación de FDG. Para esto, se piensa que los MTS son el mejor modelo celular *in vitro*, que permite una evaluación sencilla de la captación de FDG y un medio para observar los efectos sobre el crecimiento celular. El procedimiento está asociado de forma ideal con evaluaciones de la inducción de apoptosis, proliferación y otros biomarcadores celulares (Fig. 14).

El Paclitaxel y Docetaxel tienen una actividad conocida frente a una amplia variedad de tipos tumorales, que incluyen cáncer de mama, ovárico, de pulmón, de cabeza y cuello. Estos potentes fármacos antineoplásicos se unen a la región N-terminal de β -tubulina y promueven la formación de microtúbulos altamente estables que resisten la despolimerización, evitando de este modo la división celular normal y bloqueando el ciclo celular en la fase G2-M. Al combinar [^{18}F]FDG-PET y análisis de imágenes, se controló el efecto de Paclitaxel durante 3 días sobre dos líneas de cáncer de mama humano diferentes, en una concentración de 10 nM, 100 nM y 1 μM , añadidas después de 5 días de crecimiento como MTS. En BT474, se observó un transporte de glucosa reducido por volumen viable incluso a la menor dosis y el tiempo de tratamiento más corto. El efecto fue más moderado en MCF-7. Estos resultados indican alteración en la fisiología de las células como una consecuencia del tratamiento con taxanos que se puede registrar con [^{18}F]FDG-PET.

La Doxorubicina es un antibiótico de antraciclina producido por el hongo *Streptomyces peucetius*. Daña el ADN por intercalación de la porción de antraciclina, quelación con ión metálico o por generación de radicales libres. También se ha demostrado que la Doxorubicina inhibe la ADN topoisomerasa II que es crítica para la función del ADN. La actividad citotóxica no es específica de fase de ciclo celular. También se conoce que la Doxorubicina se activa por el sistema de transporte de electrones mitocondrial y provoca un fallo de energía mitocondrial. Por tanto, el efecto puede ser no solamente por daño del ADN, sino también por daño del metabolismo energético. En nuestros experimentos, la Doxorubicina disminuyó el transporte de glucosa a la mayor dosis. Los datos sugieren que [^{18}F]FDG registraría un efecto antitumoral de Doxorubicina en la fase temprana de tratamiento a dosis pertinentes. El efecto de Doxorubicina era más intenso en MCF-7 que en BT474.

El Tamoxifeno es un anti-estrógeno no esteroideo sintético. Se piensa que bloquea competitivamente los receptores de estrógenos. Otros efectos bioquímicos del Tamoxifeno incluyen la interacción con proteína cinasa C y estimulación de células NK humanas. Como se esperaba, el efecto del Tamoxifeno se puede observar solamente en MCF-7. En nuestros experimentos, el efecto del Tamoxifeno puede relacionarse solamente con una alteración del transporte de glucosa.

El mesilato de Imatinib es un inhibidor de proteína tirosina cinasa que inhibe la tirosina cinasa Bcr-Abl, la tirosina cinasa anormal constitutiva creada por la anormalidad de cromosoma de Filadelfia en leucemia mieloide crónica (CML). Inhibe la proliferación e induce la apoptosis en líneas celulares positivas a Bcr-Abl así como en células leucémicas nuevas de leucemia mieloide crónica positiva a cromosoma de Filadelfia.

El Imatinib no es completamente selectivo; también inhibe los receptores tirosina cinasa para factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de células madre (SCF), c-Kit e inhibe de este modo los acontecimientos celulares mediados por PDGF y SCF. En nuestros experimentos no se observó ningún efecto de Imatinib.

Conclusiones

Para concluir, la combinación de radiotrazadores de PET, análisis de imágenes del patrón de crecimiento e inducción de necrosis más análisis histoquímicos de proliferación y apoptosis en MTS proporciona un buen modelo para evaluar la relación entre el volumen tumoral y la captación de trazador metabólico antes y después de la quimioterapia. Esta característica se podría usar para cribar y seleccionar biomarcadores de PET para la evaluación temprana de la respuesta al tratamiento.

Además, este nuevo procedimiento proporciona una posibilidad de evaluar rápidamente, e *in vitro*, un buen perfil preclínico de fármacos anticancerosos existentes y recién desarrollados. Usado clínicamente en biopsias, este procedimiento se podría usar potencialmente en un nivel individual, en primer lugar para seleccionar un tratamiento para un paciente particular y después para seleccionar el trazador de PET para controlar en un corto periodo de seguimiento el fármaco y régimen de dosis óptimos.

Ejemplo 3

SASDM para Estudiar MTS

En el presente estudio se ha desarrollado un procedimiento eficaz, rápido y semi-automatizado (SASDM) para determinar el tamaño de los MTS. El procedimiento se aplicó y ensayó en MTS de tres líneas celulares diferentes. Se usó la autorradiografía de sección congelada y tinción con H y E para confirmación adicional.

Materiales y Procedimientos

1. Cultivo celular

Se usaron tres líneas celulares convencionales para la investigación del rendimiento de este procedimiento;

- MCF-7, una línea celular de cáncer de mama humano (Colección Europea de Cultivo Celular).
- U-343, una línea celular de glioma humano.
- BON, una línea celular de tumor neuroendocrino humano (una donación del Dr. C. M Townsend, Universidad de Texas, Galvestone, EE.UU) obtenida de un metástasis de ganglio linfático de un carcinoma pancreático.

Las células MCF-7 se cultivaron en medio MEM-Eagle complementado con FCS al 10%, piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales al 1% y penicilina al 5% (Tamro). Las células U-343 se cultivaron en medio F-10 de Ham complementado con FCS al 10%, piruvato sódico 1 mM y L-glutamina 2 mM (Tamro). Las células BON se cultivaron en medio F-12K de Ham (NordCell, Suecia) mezclado con medio DMEM complementado con FCS al 10%, piruvato sódico 1 mM y L-glutamina 2 mM (Tamro).

El medio se cambió dos veces por semana y las células se mantuvieron en fase de crecimiento exponencial.

2. Cultivo de tumor multi-celular

Las células tumorales se tripsinizaron del cultivo en monocapa madre, después, las suspensiones celulares se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos revestidas con agarosa al 1%, con aproximadamente 50.000 células por pocillo para U-343 y MCF-7 y 15.000 para BON. Los cultivos se mantuvieron a 37°C con CO₂ al 5% y se cultivaron durante un periodo que dependía de la velocidad de duplicación para cada línea celular.

El medio MTS para MCF-7 era DMEM complementado con FCS al 10%, piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales al 1%, Penicilina al 5% (Tamro), 0,01 mg/ml de Insulina y β -Estradiol 1 nM (Sigma Aldrich).

3. Análisis de imágenes

Los agregados se fotografiaron diariamente usando una cámara digital Nikon Colorpix4500 (www.nikon.com) montada en un microscopio Zeiss Axiovert 135 (www.zeiss.com). La cámara digital se ajustó para utilizar hasta 4,0 millones de píxeles efectivos, con una resolución de imagen de 640x480, auto-enfoque, modos de auto-disparo, con calidad de imagen "Hi" aplicada.

Se usó un objetivo de 5x aumentos, 5x/0,12; 44 01 20 en el Microscopio Zeiss Axiovert 135 dependiendo el ajuste de la intensidad de la luz de fondo del color del medio que se usó para cultivar los MTS deseados.

Las imágenes se guardaron como secuencias de archivos JPEG en una tarjeta Scan Disc Compact Flash de 128 MB y se transfirieron al disco duro de un ordenador personal con Windows 2000 instalado para análisis de imágenes y estadístico adicional.

Se desarrolló un programa de software en Matlab (The Mathworks, Natick, Massachusetts) con interfaz fácil para el usuario para realizar el análisis de imágenes usando rutinas de las herramientas "procesamiento de imágenes". Para el calibrado absoluto del volumen, se usó como objeto de referencia un objeto esférico con un diámetro especificado de 0,79375 μm como se muestra en la Figura 15.

Después de introducir algunos parámetros de entrada tales como nombre de la imagen de partida, número de imágenes a analizar, nombre del proyecto, etc., el software describe automáticamente una ROI (Región de Interés) que distingue el área de necrosis del área en la que las células todavía están vivas y una ROI alrededor de todo el MTS. Esto se realiza automática y secuencialmente para todas las imágenes. El área total del MTS y el área total de necrosis se calculan como el número total de píxeles dentro de las ROI y se convierte en μm^2 usando el radio del objeto de referencia. Para el cálculo del volumen del MTS se usa la siguiente ecuación:

$$V = \frac{4}{3} \pi r^3$$

donde $r = \sqrt{\text{área}/\pi}$ se usa para el cálculo del radio de la esfera. El volumen total de la necrosis se calcula y se resta del volumen total del MTS para obtener el volumen total de la parte viva. Adicionalmente se calcula la fracción de volumen total constituida por células vivas.

Todas las imágenes con ROI descritas que distinguen las diferentes partes de los MTS se visualizan y se guardan automáticamente como archivos TIFF para observaciones adicionales. Todas las mediciones estadísticas deseadas incluyendo el volumen total de todos los MTS y el volumen total de la parte de necrosis se guardan en un archivo EXCEL con el nombre de archivo especificado para todo el grupo de MTS.

Se generaron las curvas de crecimiento para las tres líneas celulares seleccionadas para ilustrar el uso del programa. Durante los primeros pocos días de cultivo después de la siembra, los agregados se asientan, lo que significa que no siguen un patrón de crecimiento exponencial. Las curvas de crecimiento después de este periodo de 5-9 días se representaron y los datos se ajustaron a una monoexponencial para indicar el tiempo de duplicación de volumen.

4. Autorradiografía y Tinción de Sección Congelada

En un punto de tiempo seleccionado, algunos de los MTS se incubaron con Fluoro-Desoxi-Glucosa (FDG) marcada con ^{18}F para confirmar el alcance de la parte de necrosis. Después de 40 minutos de incubación con 100 MBq/ml de FDG y lavado durante 3*5 minutos, los MTS se congelaron rápidamente a -20°C y se seccionaron para autorradiografía.

Las secciones con un grosor de 25 μm se expusieron en una placa de fósforo para formación de imágenes durante un periodo de 20 horas. La exploración y formación de imágenes se realizó usando el software Image Quant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Para verificación adicional se utilizó tinción con Hematoxilina y Eosina de las secciones. Esta parte era una parte complementaria para aclarar algunas características histológicas en los MTS.

Resultados

Los agregados multicelulares de todas las líneas celulares mostraron directamente después de la siembra una característica uniforme sin necrosis, que después de un periodo de unos pocos días, cambia a la característica típica mostrada en las Figuras 16, 18 y 20, con un borde de células viables rodeando una necrosis central. Las formas eran

ligeramente diferentes y los tamaños de los agregados individuales también eran diferentes. La descripción automática de la necrosis y la periferia total se comportó de manera apropiada en todos los casos.

El tiempo de cálculo para un conjunto de 25 imágenes fue 17 segundos.

Se calculó que el tiempo de duplicación de volumen de MTS era 13 días para MCF-7 (Fig. 17), 57 días para U-343 (Fig. 19) y 5 días para BON (Fig. 21).

Para cada línea celular, la variabilidad dentro del grupo estaba por debajo del 15% (COV) pero era considerablemente mayor entre grupos. Esto es otra confirmación de cuán esencial es determinar el tamaño de los MTS para cada ajuste experimental.

El resultado de la autorradiografía así como el resultado de la tinción con H y E confirmó la parte de necrosis en el centro de los MTS (Fig. 22 y 23).

Discusión

El procedimiento tradicional para usar células tumorales cultivadas para evaluaciones de biología, incluyendo evaluación de captación de radiotrazador y efectos del tratamiento, utiliza el cultivo en monocapa. Este procedimiento es sencillo de aplicar, permite una fuente buena y reproducible de células y permite un cálculo sencillo del número de células contando con procedimientos más o menos sofisticados. Sin embargo, existen algunas claras desventajas para el procedimiento, especialmente con respecto a la evaluación de captación de radiotrazador y control de la respuesta al tratamiento. El aspecto principal es que el crecimiento está regulado positivamente de forma grave en monocapa en comparación con el cultivo *in vivo* debido a la ausencia de inhibición por contacto adecuada. Este crecimiento acelerado y ausencia de comunicación directa con células vecinas también cuestiona la relevancia fisiológica, con la expectativa de que la función celular es aberrante. Además, la monocapa con su crecimiento rápido cambia muy rápidamente de un cultivo celular disperso a un cultivo con crecimiento solapante y, de este modo, impide el seguimiento a largo plazo del patrón de crecimiento normal en comparación con el crecimiento con modulación farmacológica. Para superar esto, es habitual estudiar solamente los efectos a corto plazo o exponer las células a tripsinización y resiembra, un procedimiento que puede inducir cambios adicionales en la función celular.

Para la superar estas y para tener ventajas adicionales para estudios de captación de radiotrazador, desde hace tiempo se ha estado trabajando con agregados multicelulares, cultivados sobre agar como un procedimiento para tener un acceso sencillo a células. Este procedimiento tiene la ventaja adicional de que permite un lavado sencillo de los agregados seguido de una medición de la captación de radiotrazador y, después de esto, los agregados pueden volver al cultivo para evaluaciones posteriores adicionales si el radiotrazador es un trazador de PET con una semivida corta.

Un prerrequisito para una evaluación apropiada de la fisiología celular con trazadores de PET es que el valor de captación esté relacionado con la cantidad de células vivas, especialmente si se desea tener una medida apropiada a traducir en una situación *in vivo*, respectivamente en evaluaciones de efecto de tratamiento en los que se pueden esperar cambios en la proporción relativa de células viables. Por lo tanto, se ha desarrollado una rutina que incluye la cuantificación de la captación de trazador de PET que depende de una medición exacta del volumen de células viables.

El procedimiento introducido es muy eficaz, fácil para el usuario, ahorra tiempo y es más exacto que el procedimiento tradicional. Se conoce que una línea celular de tumor puede comportarse de forma diferente en condiciones diferentes. Una de las ventajas de este procedimiento es que se puede generar de forma simple una curva de crecimiento para cada línea celular en cada laboratorio y para cada ajuste experimental.

La combinación (SASDM) con evaluación biológica de los MTS proporciona un buen modelo para evaluar el efecto de diversos tratamientos de cáncer, por ejemplo, quimioterapia y radioterapia.

Conclusión

Para concluir, la combinación de radiotrazadores de PET y análisis de imagen en MTS proporciona un buen modelo para evaluar la relación entre volumen viable de tumor y la captación de trazador metabólico antes y después de quimioterapia. Esta característica se podría usar para una selección de biomarcador de PET para una evaluación temprana de respuesta al tratamiento.

Realizaciones Específicas, Cita o Referencias

La presente invención no se debe limitar en alcance por realizaciones específicas descritas en el presente documento. De hecho, serán evidentes diversas modificaciones de la invención además de las descritas en este documento para el especialista en la técnica a partir de la anterior descripción y las figuras adjuntas. Se pretende que tales modificaciones pertenezcan al alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de cribado de trazadores de tomografía de emisión de positrones (PET) en la supervisión precoz de terapia de cáncer, que comprende:
- 10 (a) proporcionar cultivos de esferoides de tumor multicelulares (MTS),
- (b) tratar dichos cultivos de MTS con agente o agentes anticancerosos a una concentración predeterminada durante un tiempo de tratamiento predeterminado,
- 15 (c) determinar los volúmenes viables de los MTS,
- (d) incubar los MTS con trazadores de PET de interés durante un periodo de tiempo predeterminado,
- 20 (e) medir la captación total de trazador de PET para cada tratamiento de los MTS y
- (f) analizar los datos de la captación de trazador de PET por unidad de volumen viable de los MTS y determinar el trazador o trazadores de PET adecuados para cada agente anticanceroso.
2. Un procedimiento de la reivindicación 1, en el que la terapia de cáncer es terapia de cáncer de mama.
3. Un procedimiento de la reivindicación 1, en el que los volúmenes viables de los MTS se determinan por el procedimiento de determinación de tamaño semi-automatizado (SASDM), que comprende:
- 25 (a) formar imágenes de un objeto de referencia,
- (b) formar imágenes de MTS y
- 30 (c) calcular el volumen viable de MTS basándose en el área total visualizada de los MTS, área visualizada de necrosis de MTS, área total visualizada del objeto de referencia y área total conocida del objeto de referencia.
4. Un procedimiento de la reivindicación 1, el procedimiento comprende además una etapa de usar metodología de diseño de experimento (DOE) para diseñar el experimento antes de la etapa (a) y en el que se usa metodología de DOE para analizar datos en la etapa (f).
- 35 5. Un procedimiento de la reivindicación 4, en el que el diseño de DOE comprende factores y respuesta.

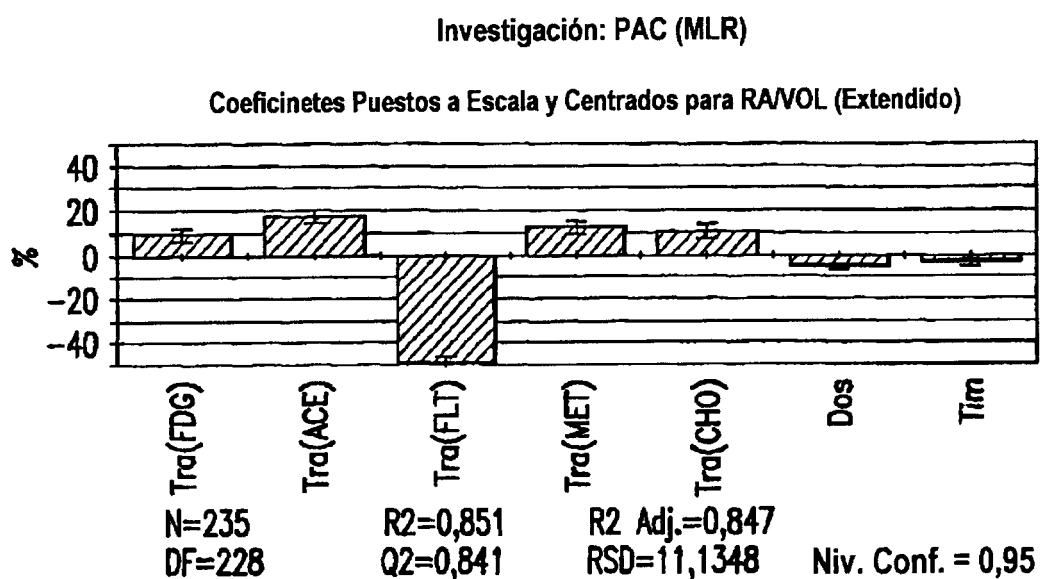


FIG.1A

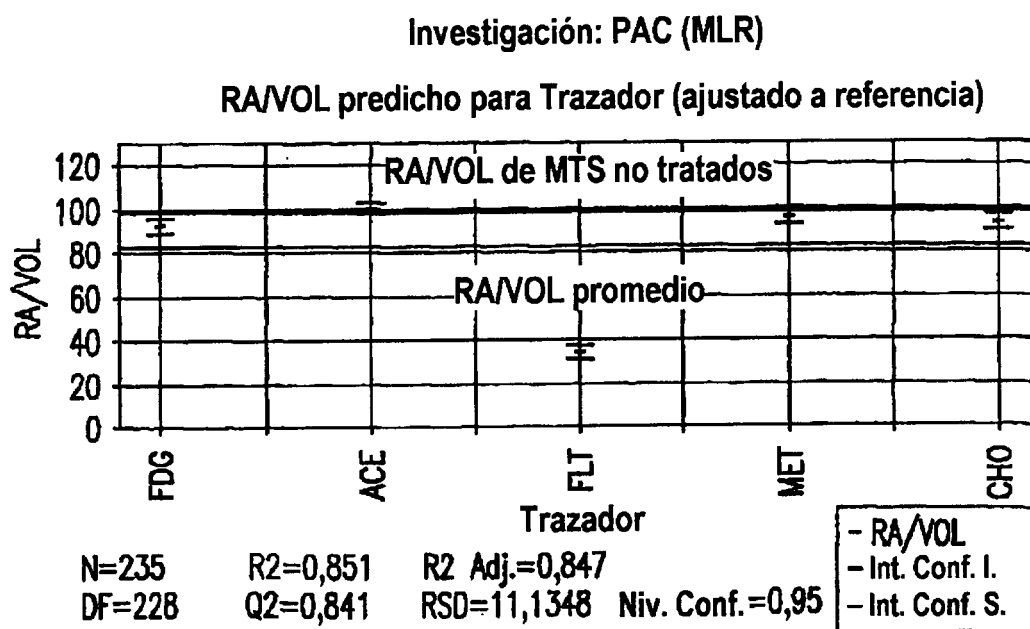


FIG.1B

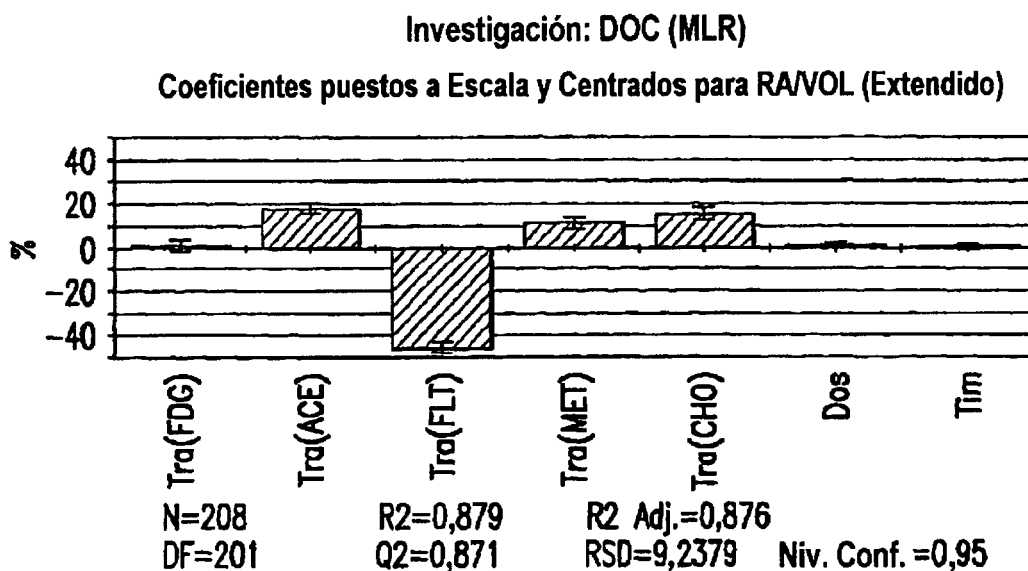


FIG.2A

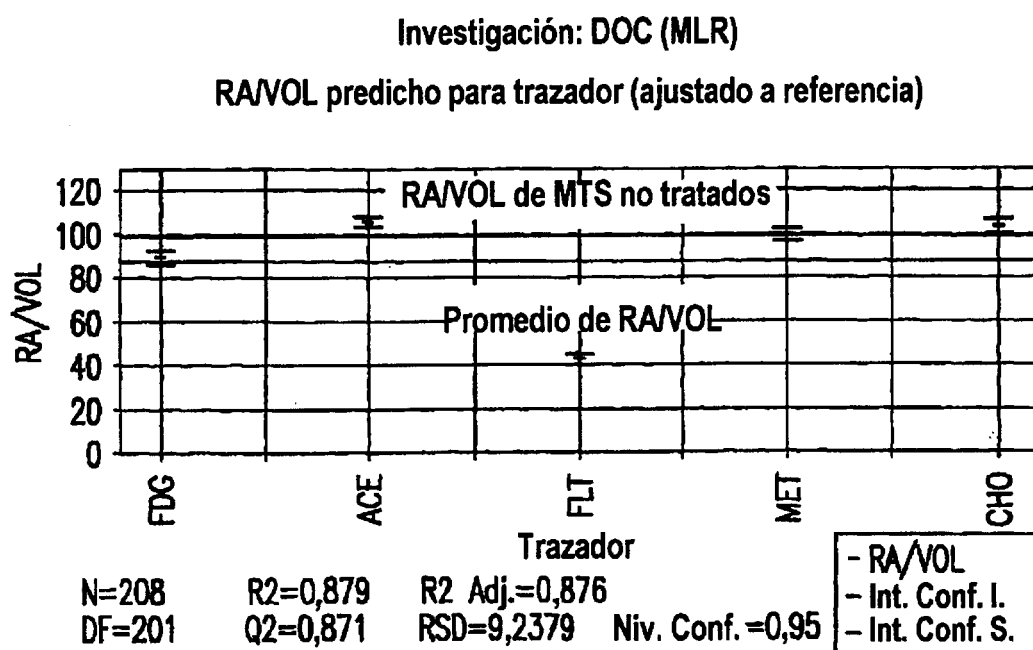


FIG.2B

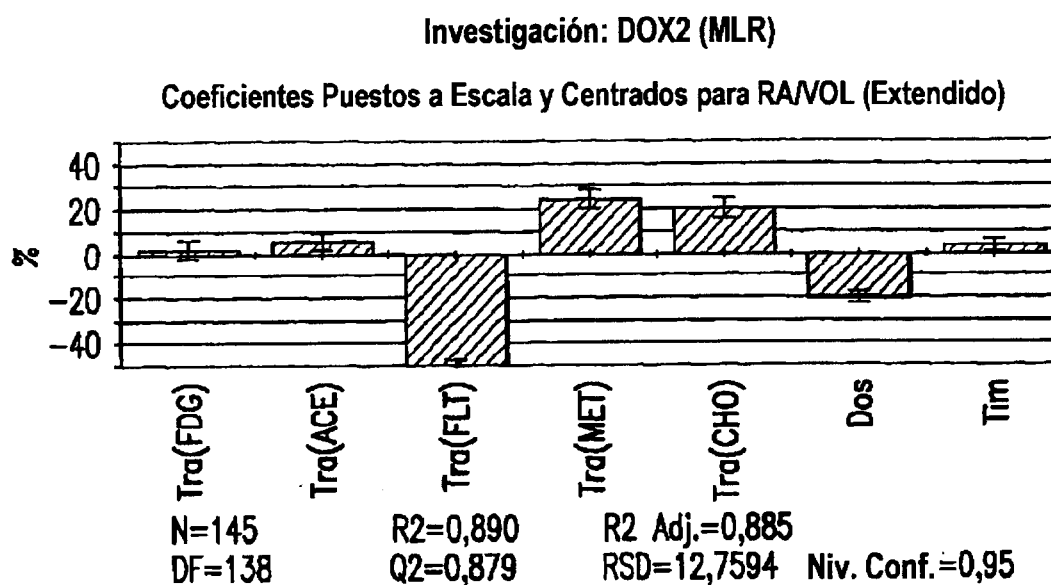


FIG.3A

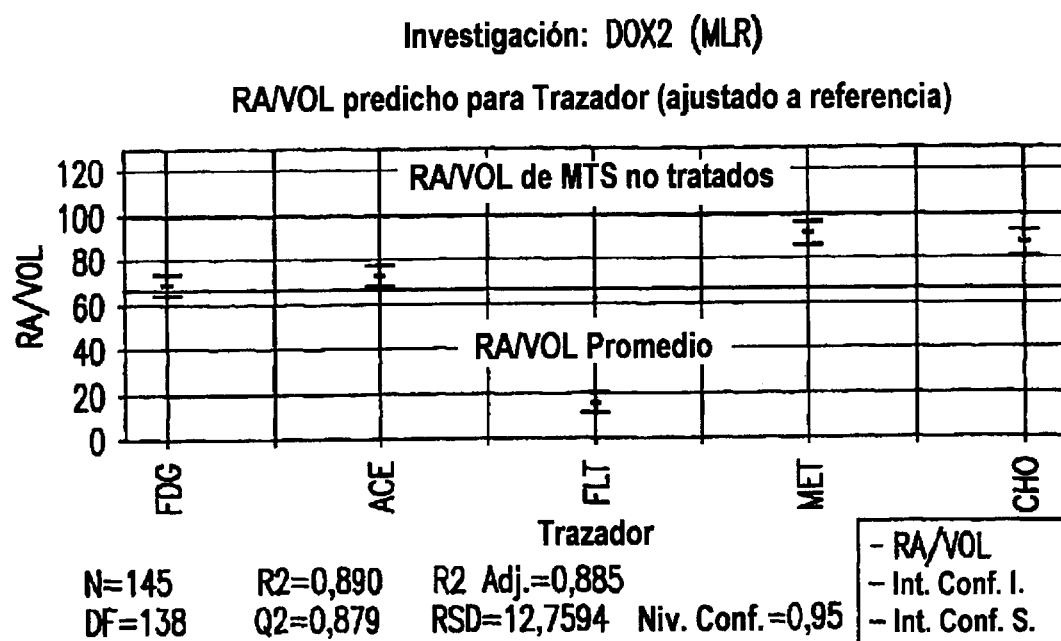


FIG.3B

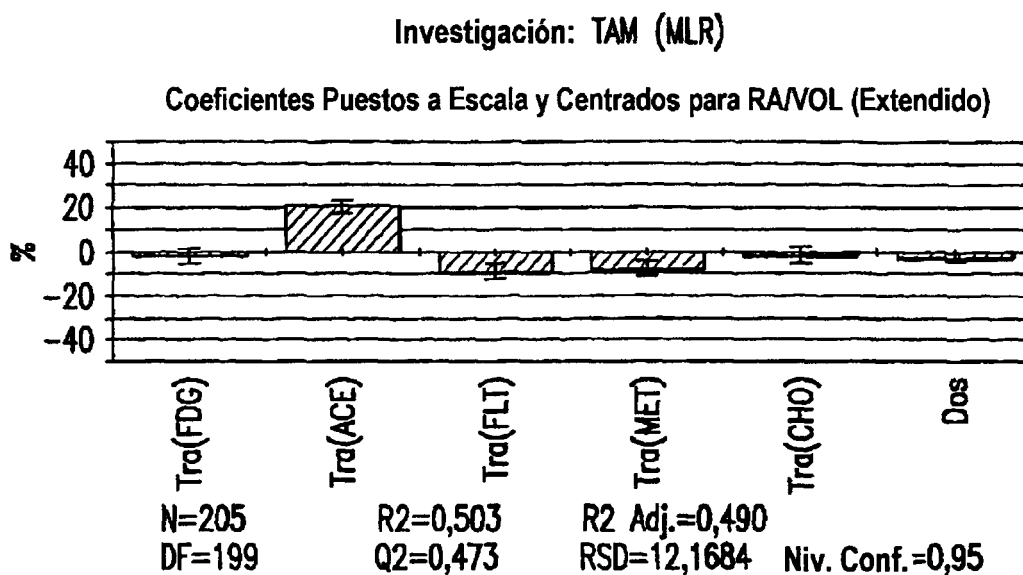


FIG.4A

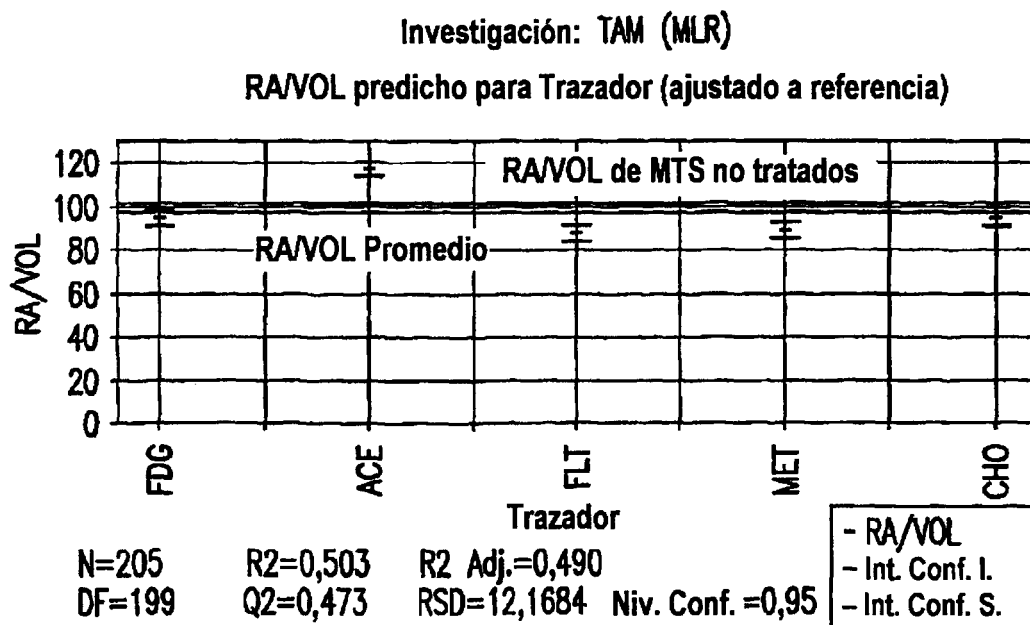


FIG.4B

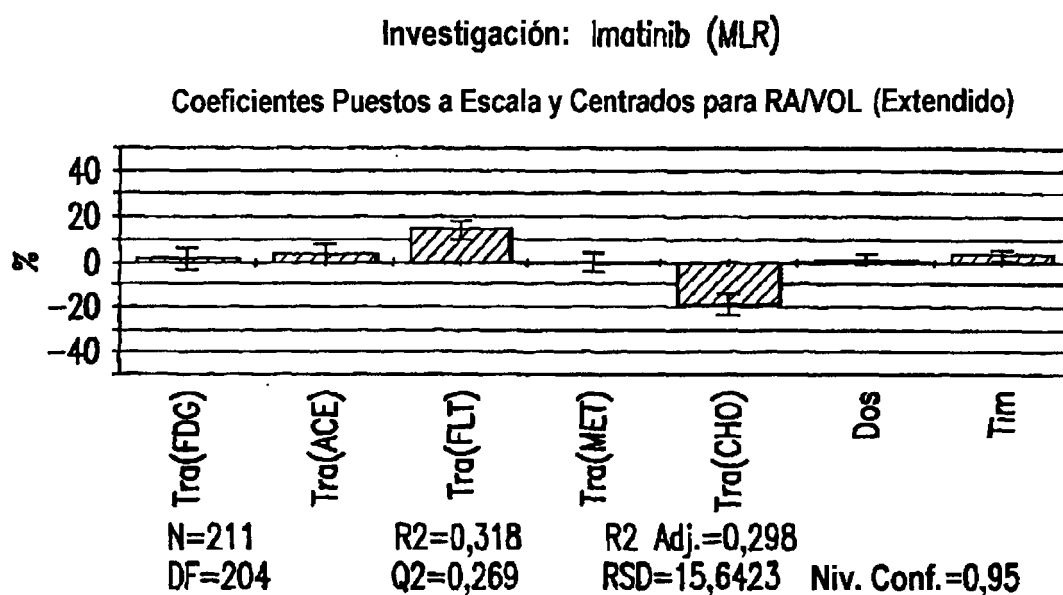


FIG.5A

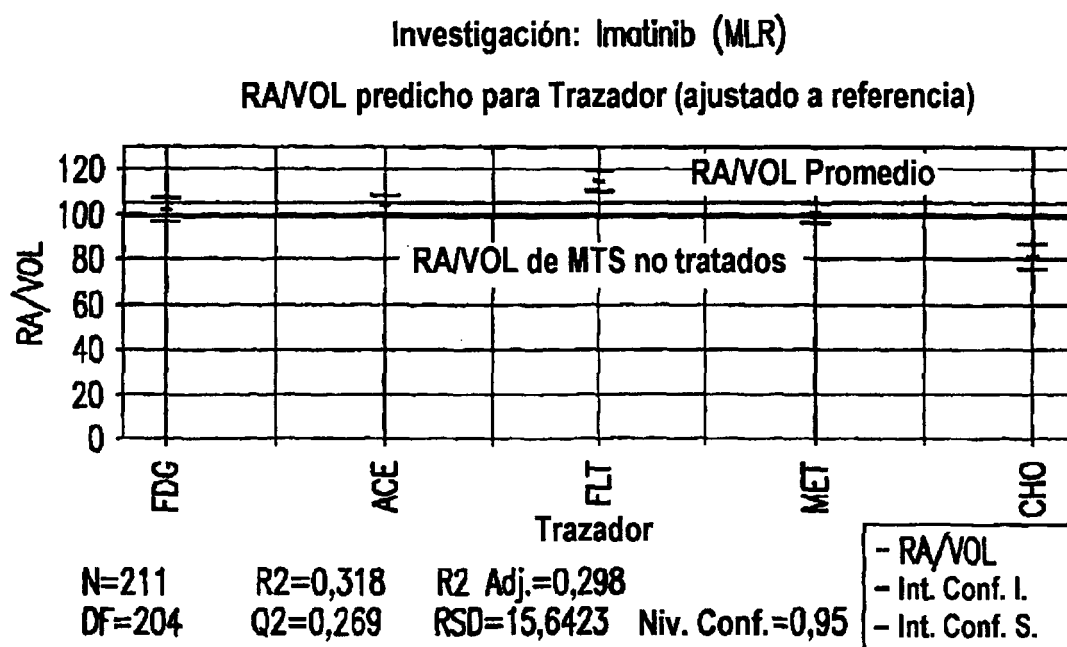


FIG.5B

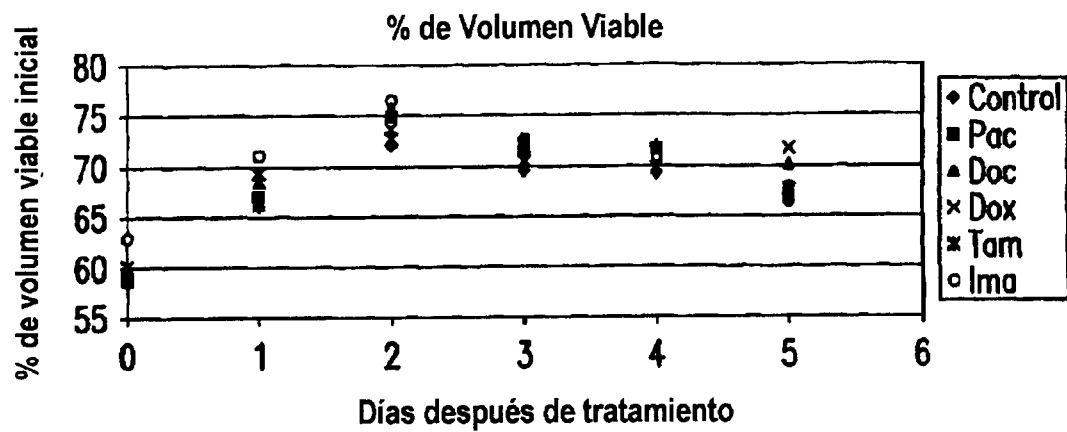


FIG.6

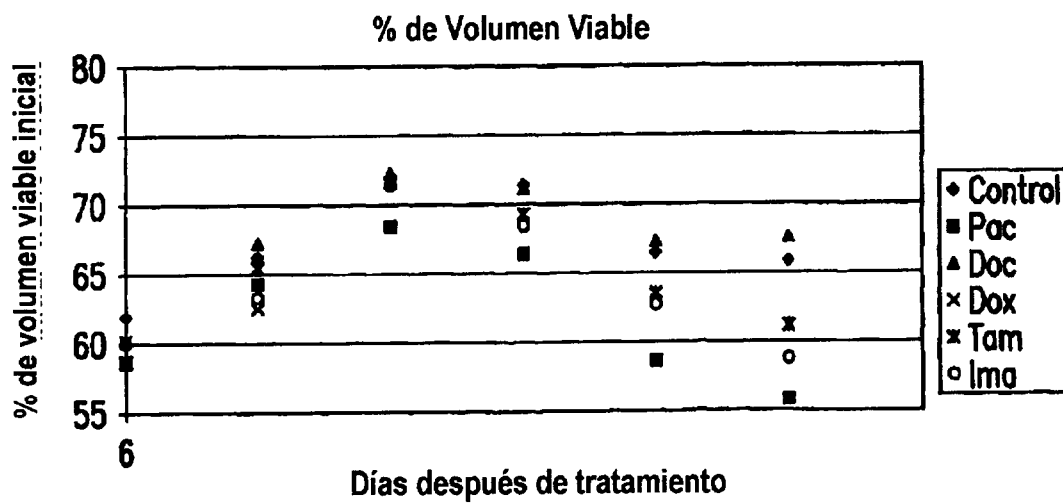


FIG.7

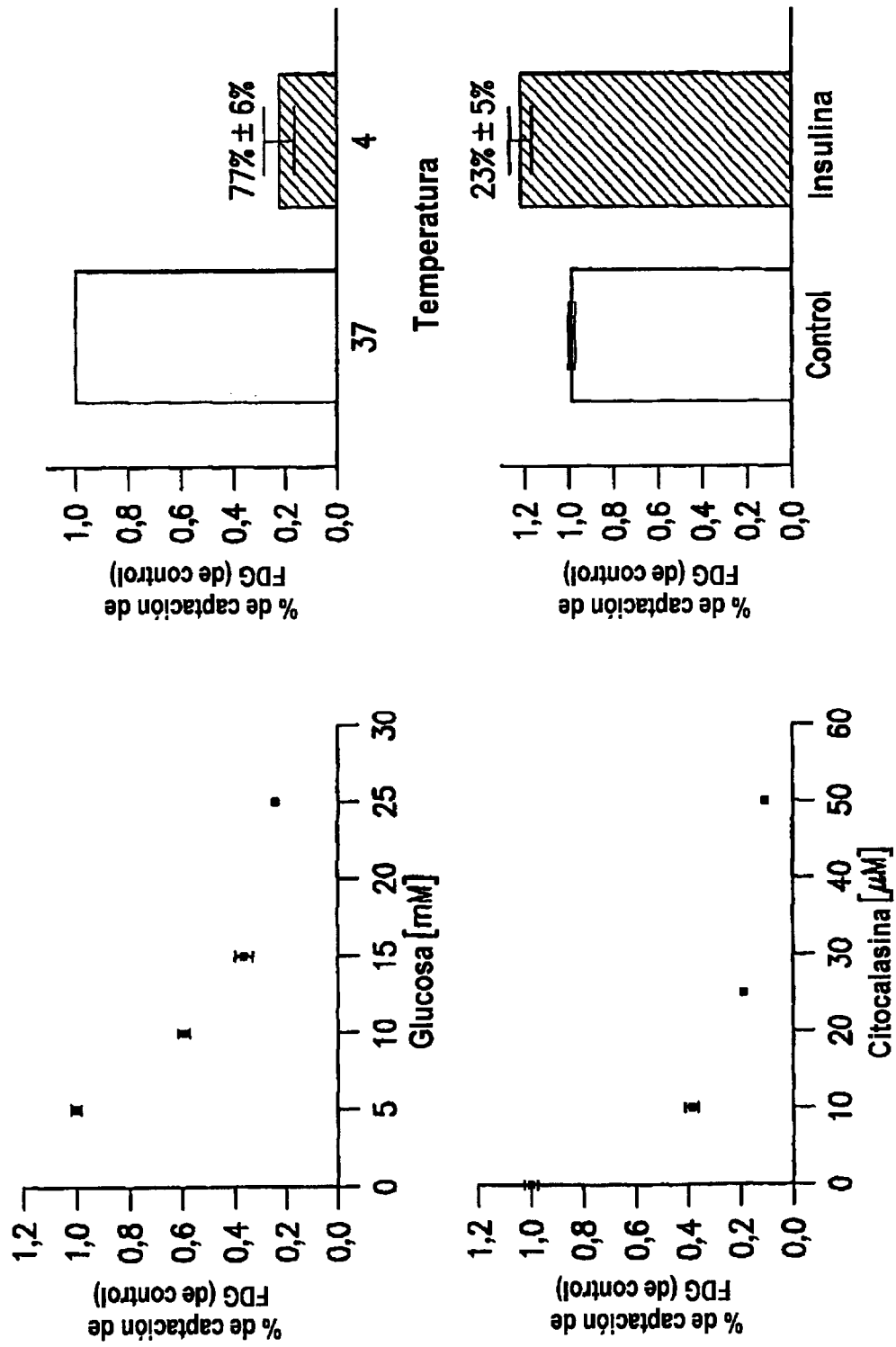


FIG.8

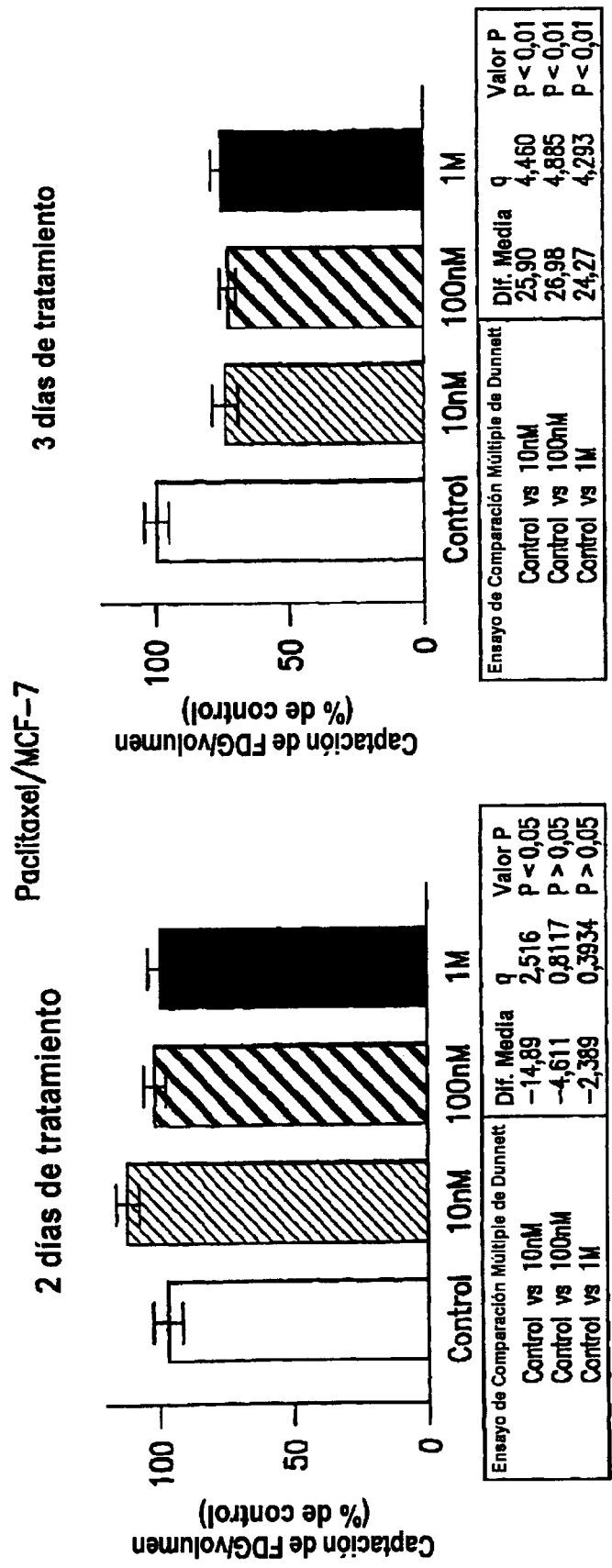


FIG.9A

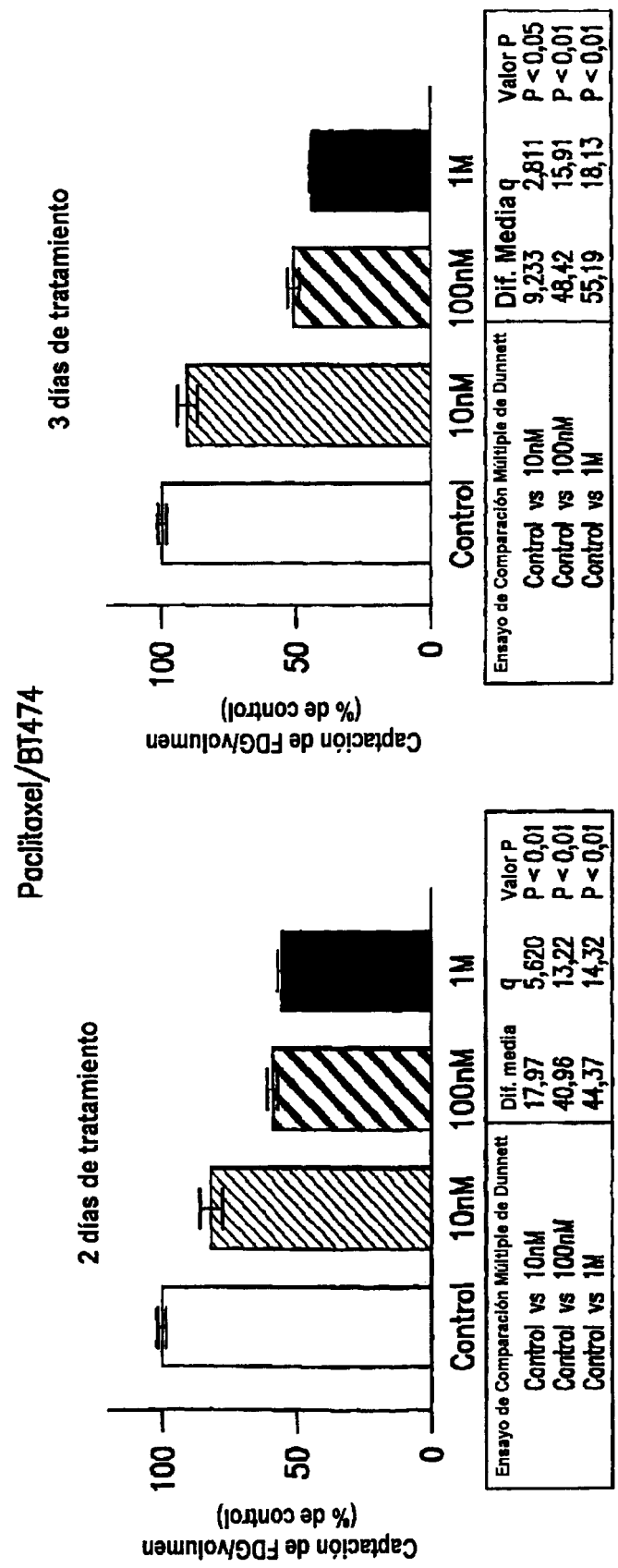


FIG.9B

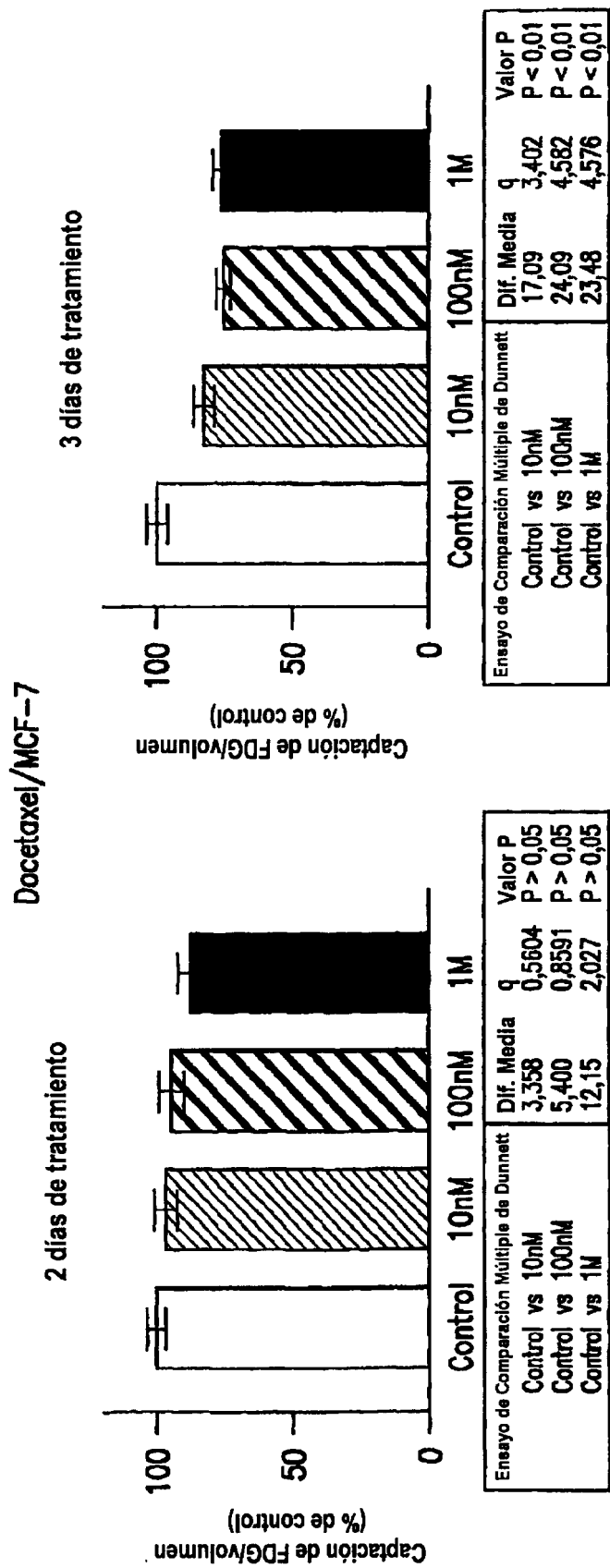


FIG.10A

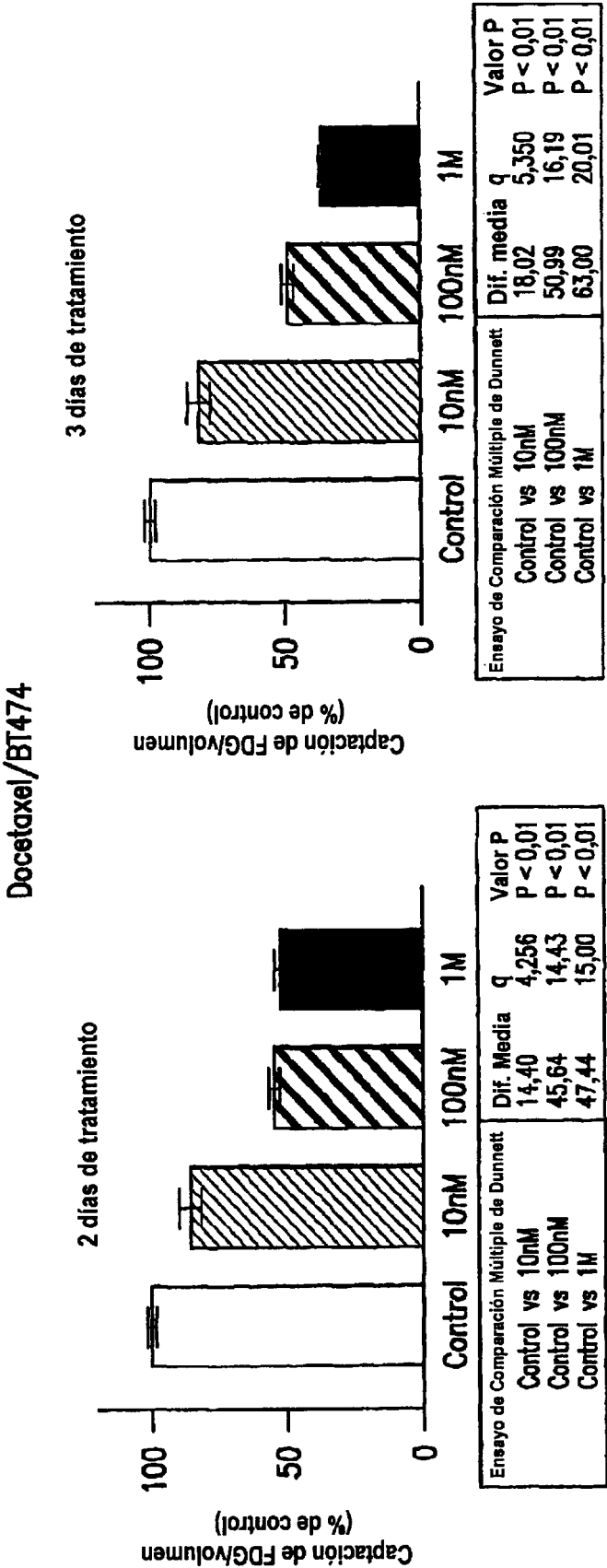


FIG. 10B

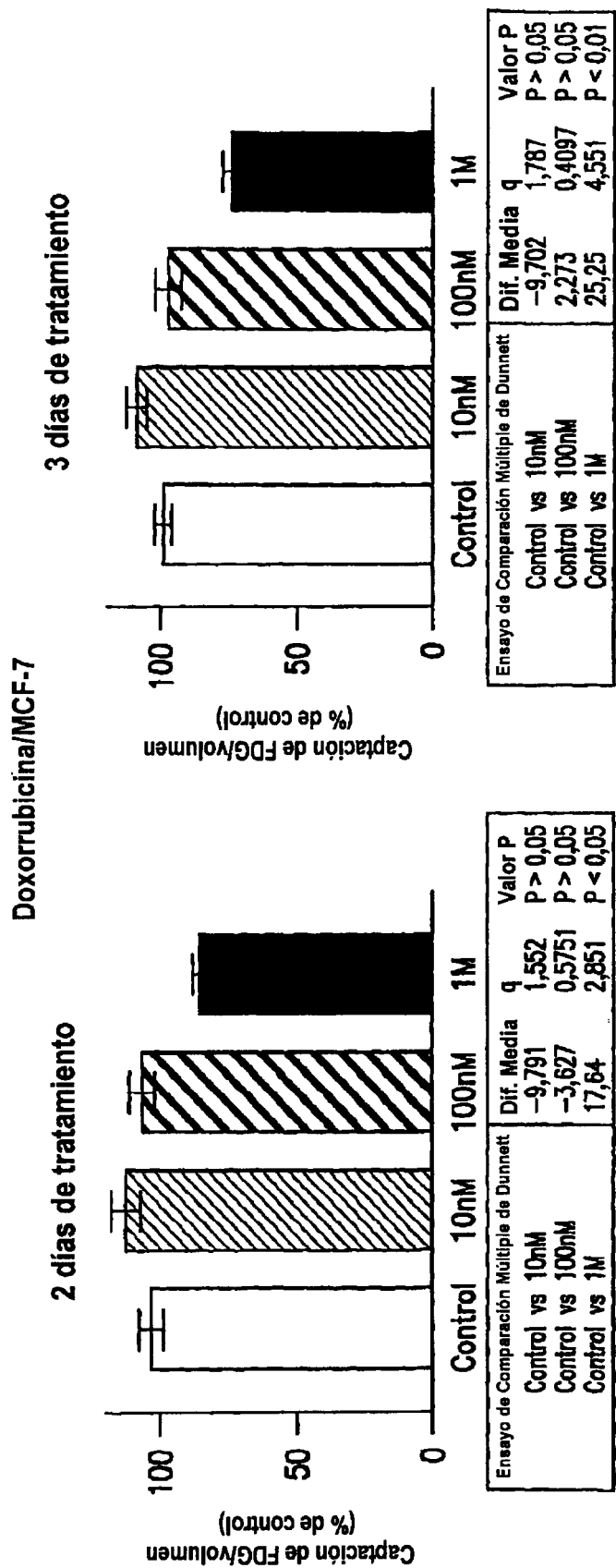


FIG.11A

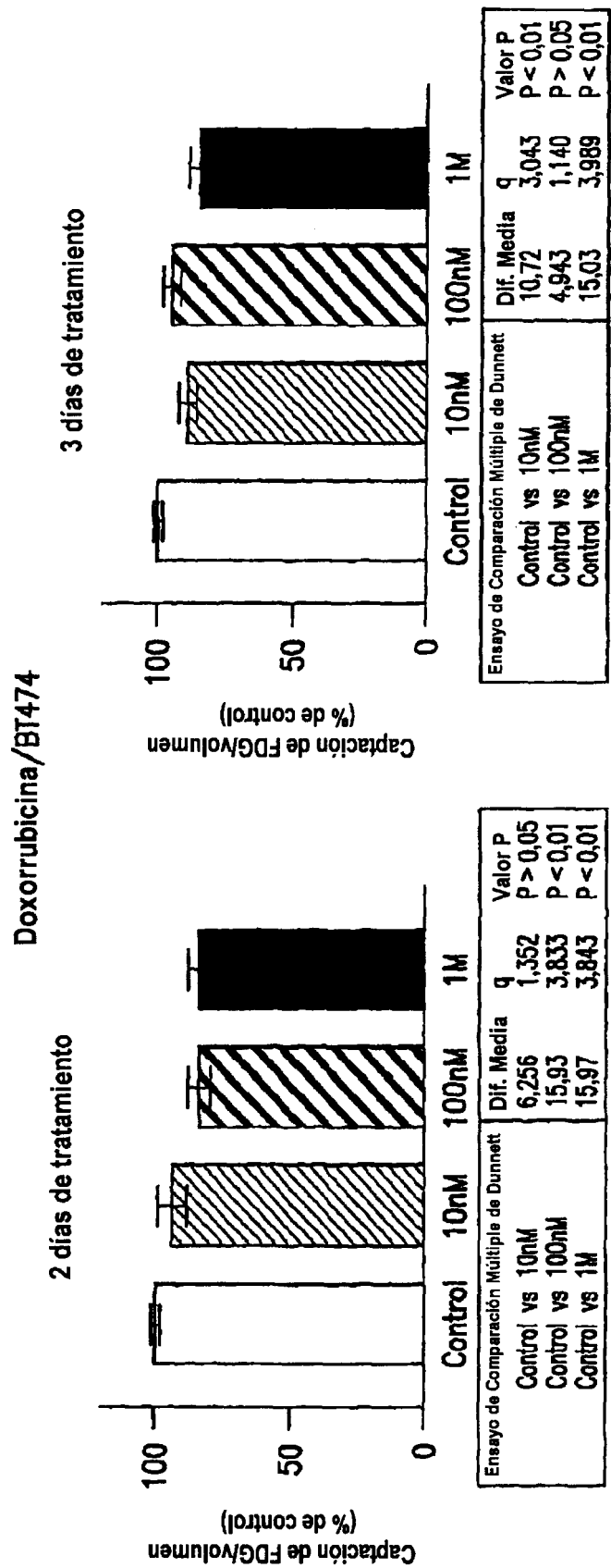


FIG.11B

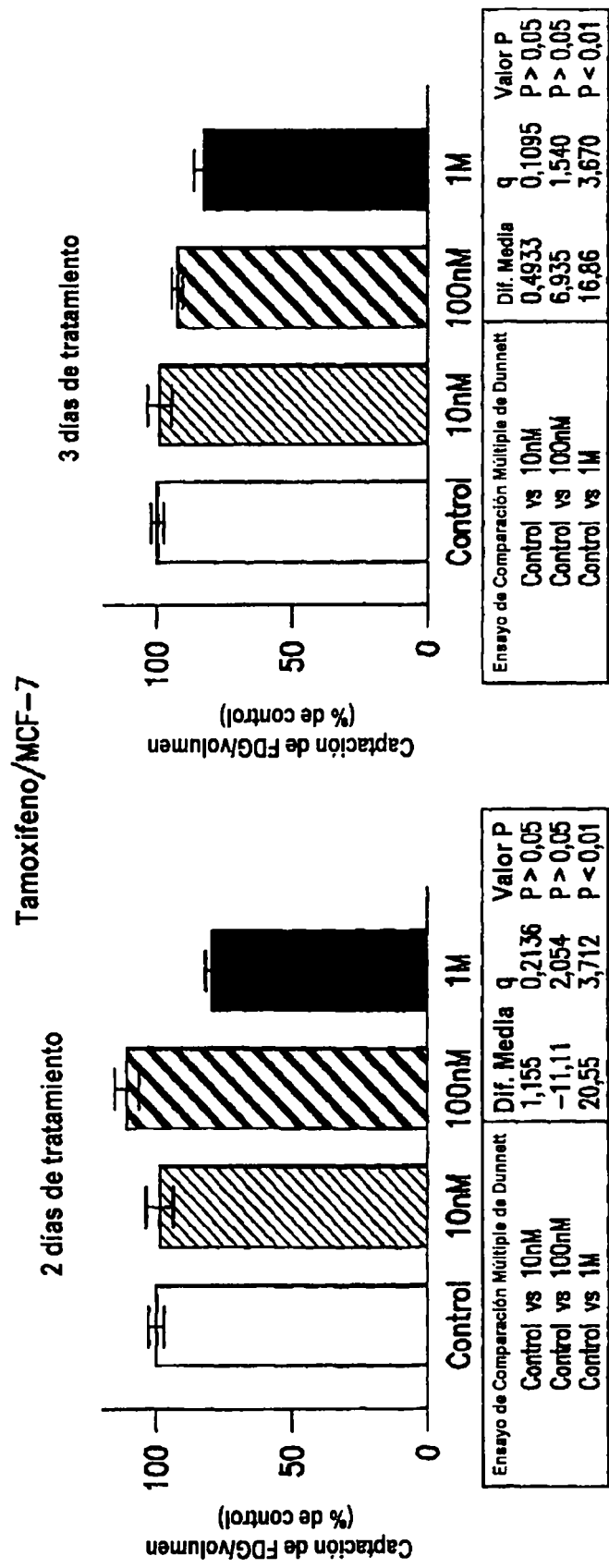


FIG.12A

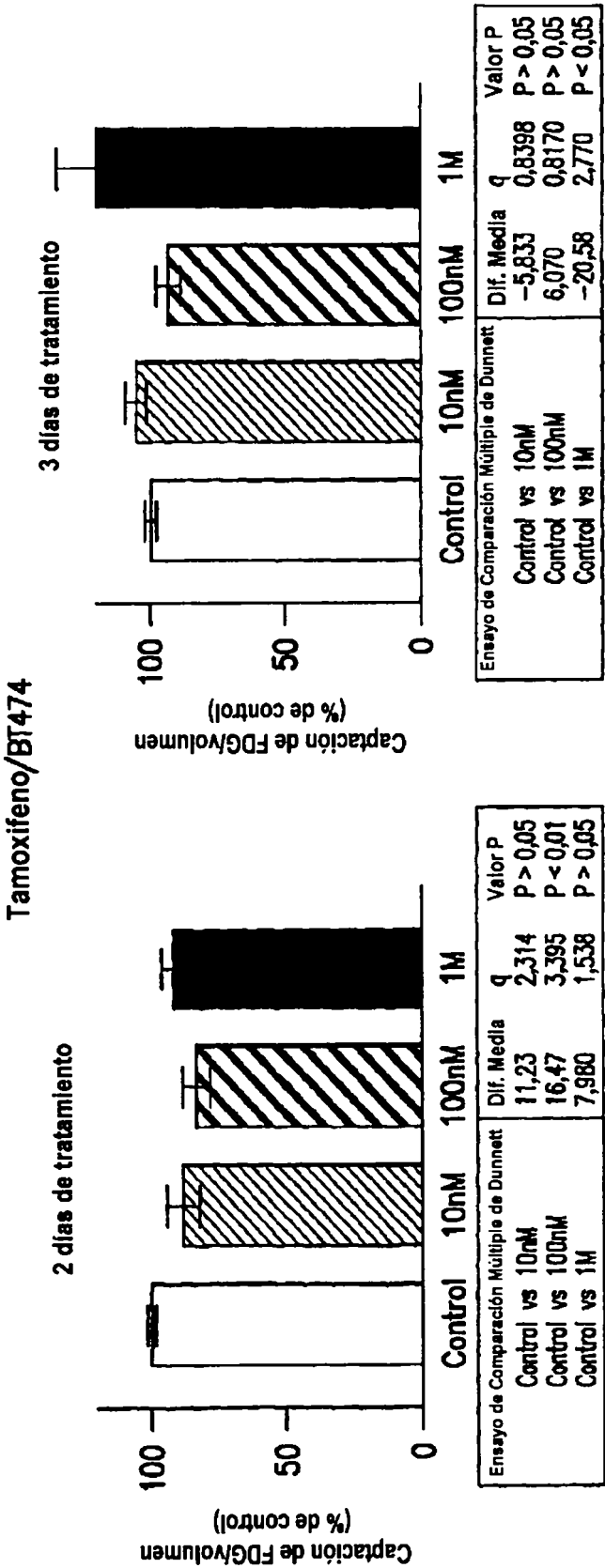


FIG.12B

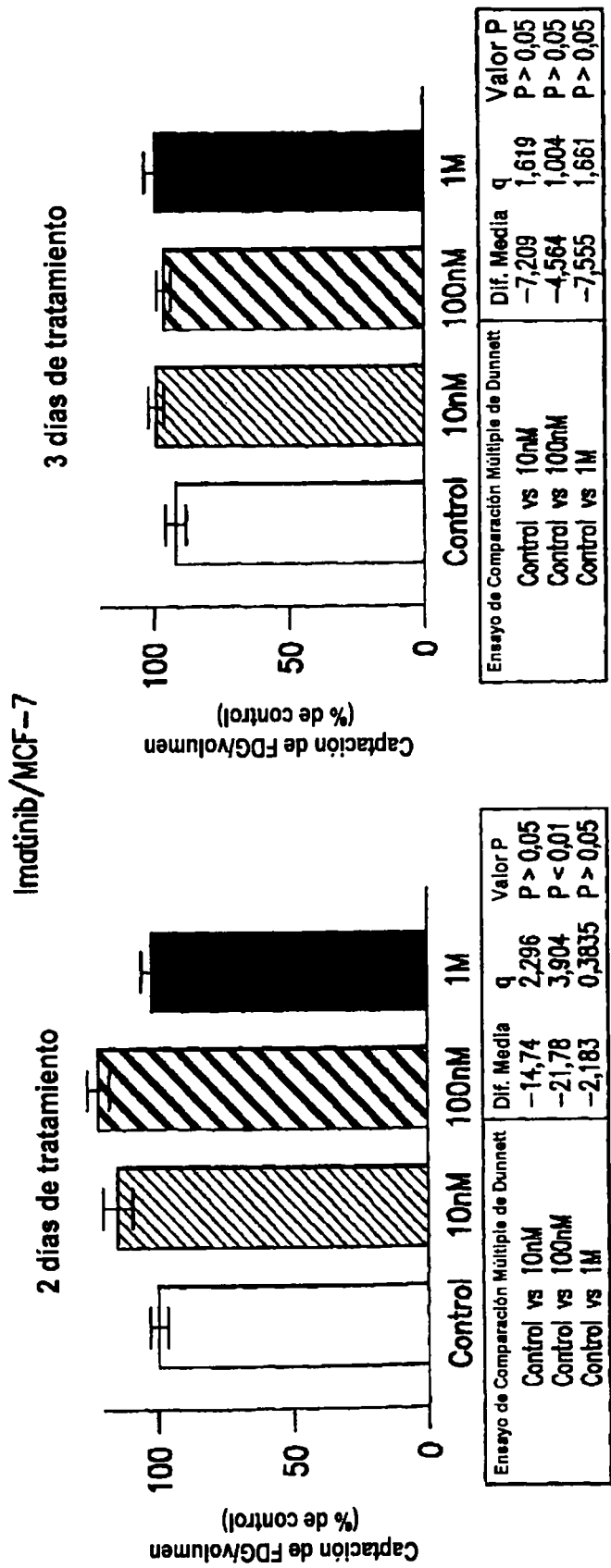


FIG.13A

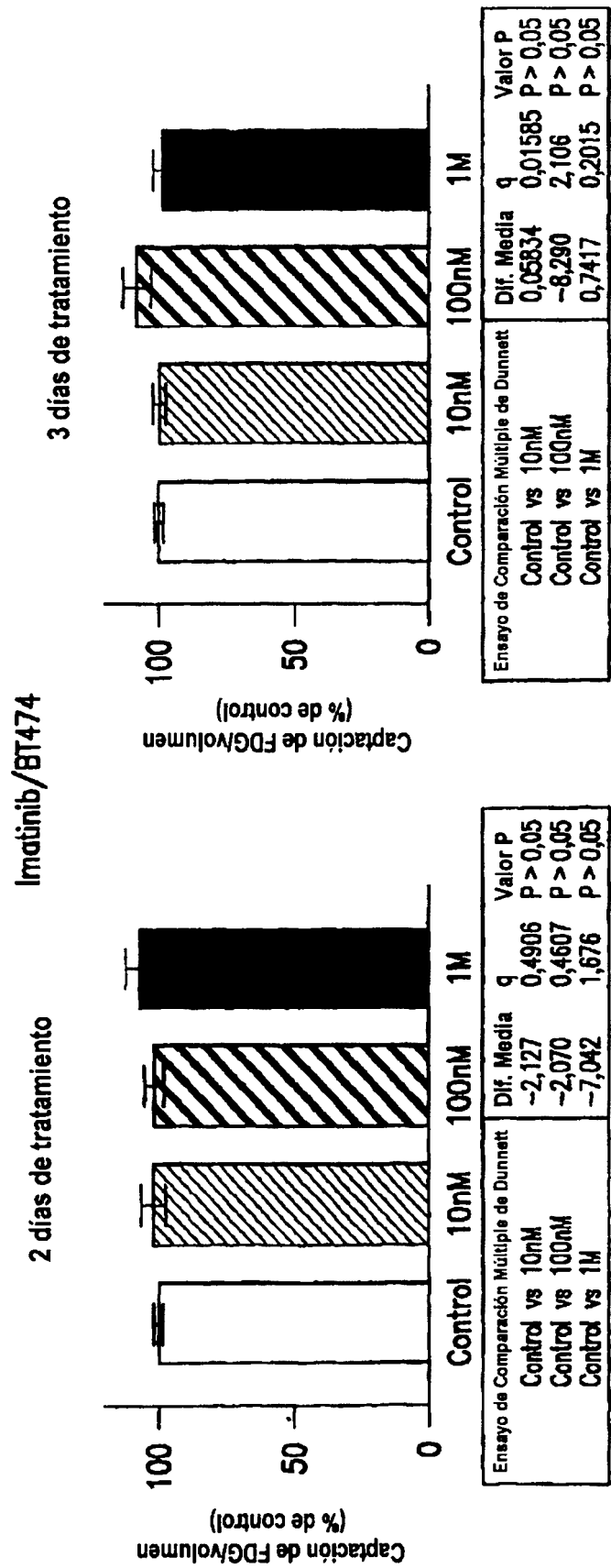


FIG.13B

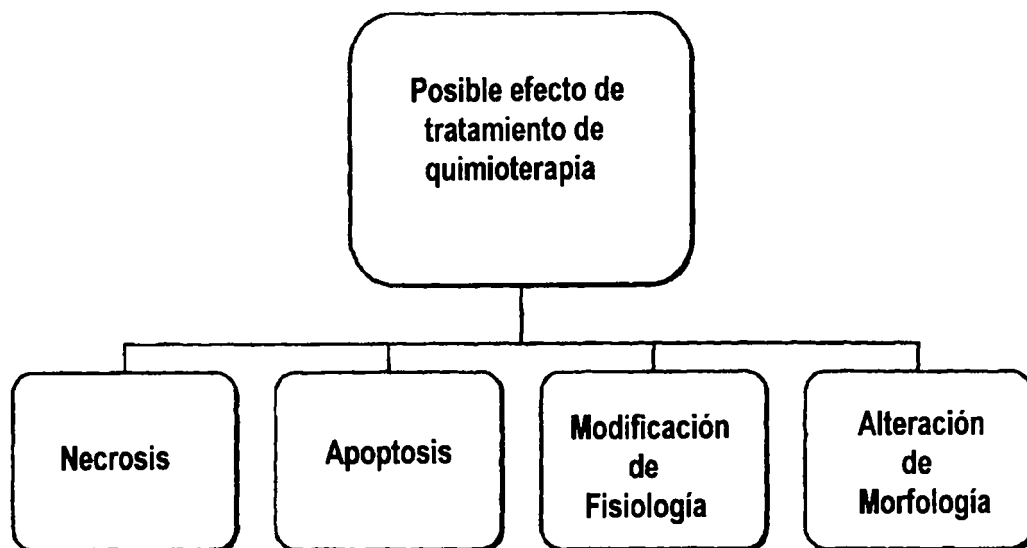


FIG.14

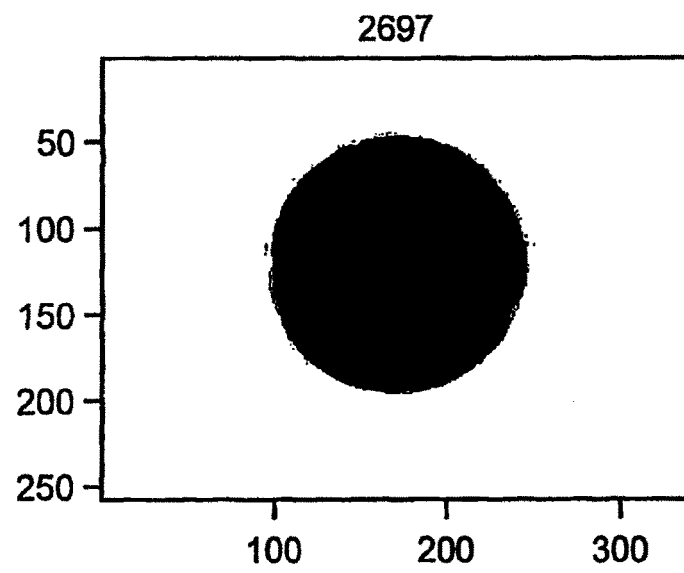


FIG.15

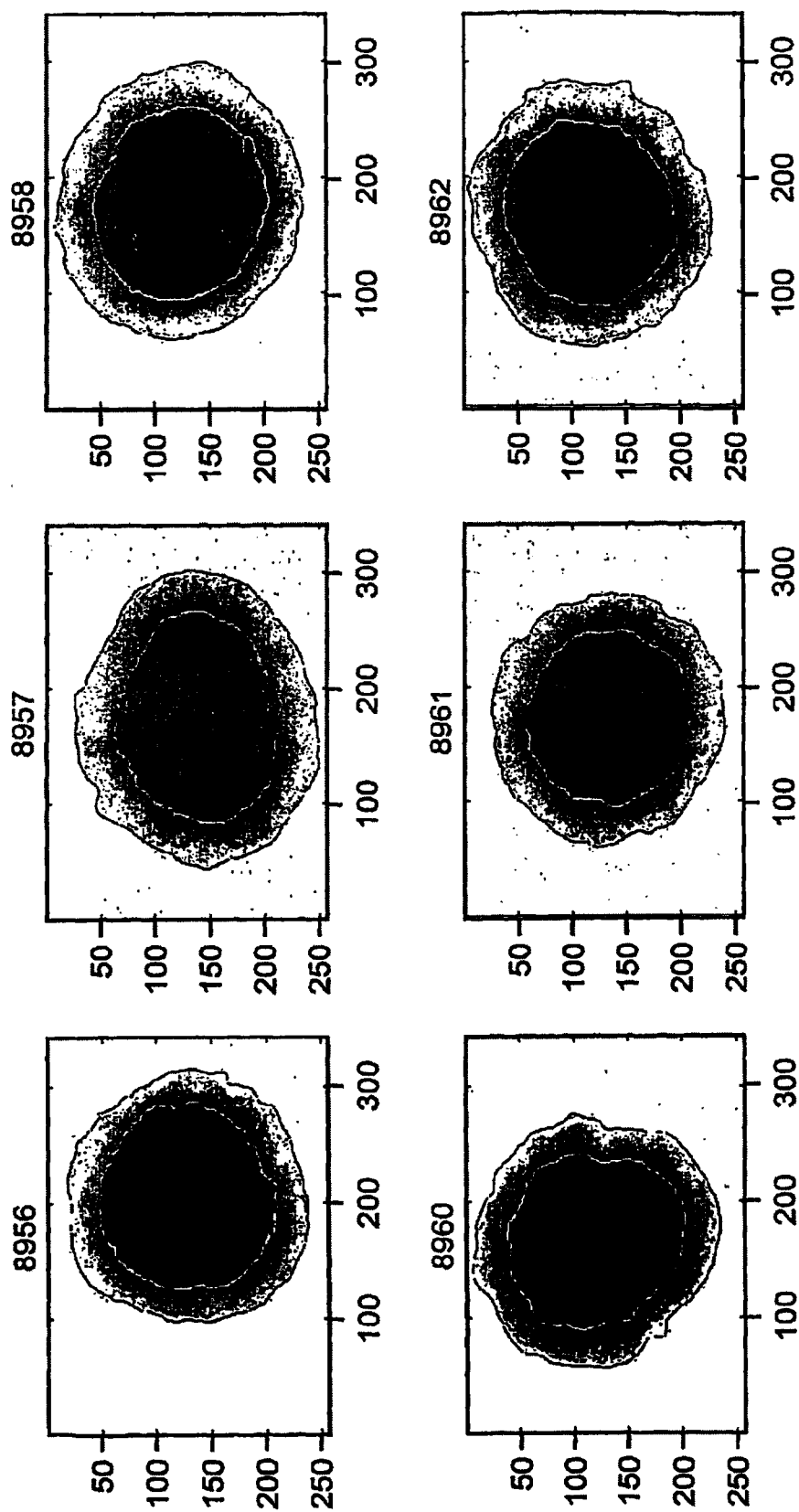


FIG.16

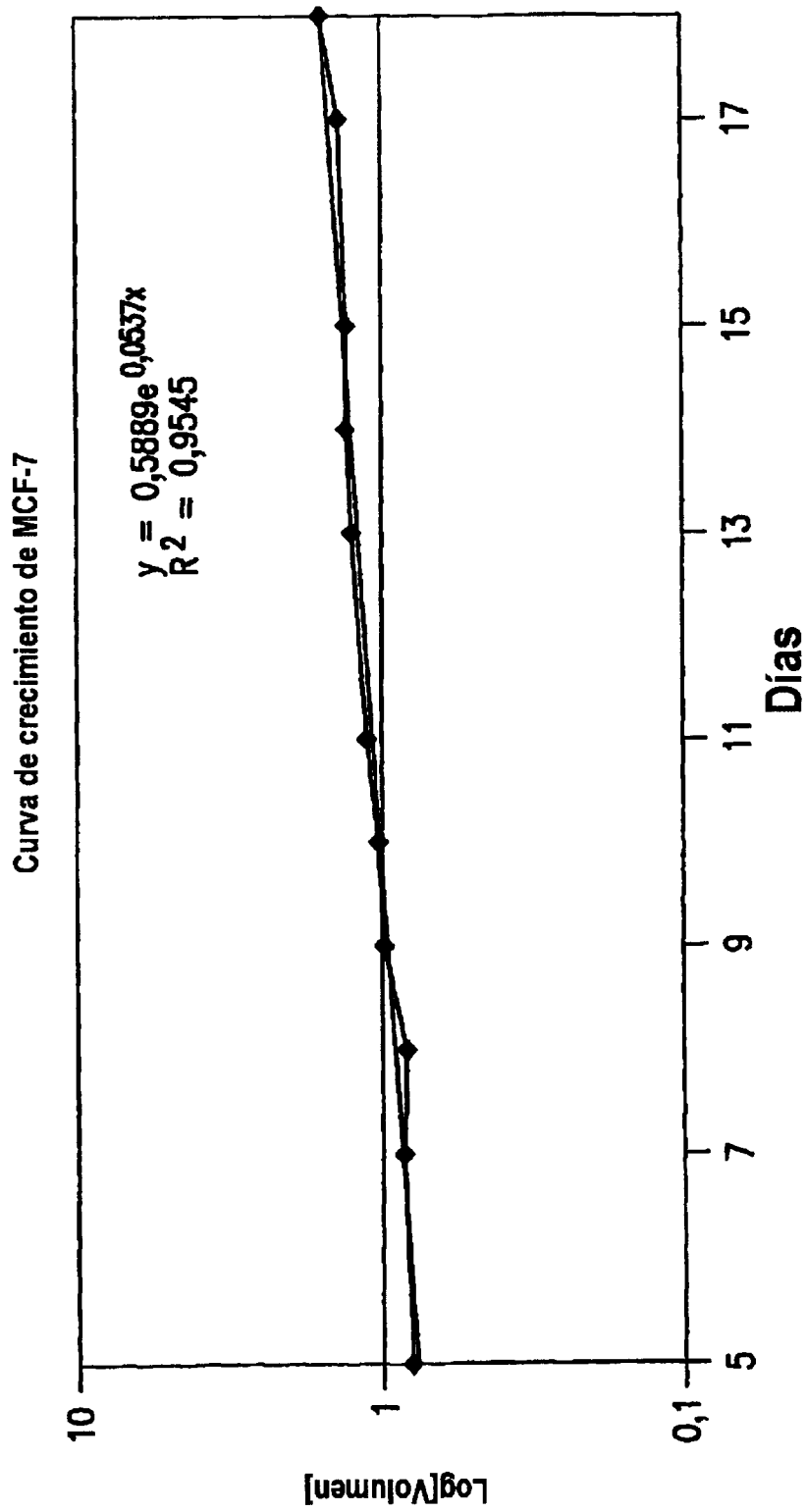


FIG.17

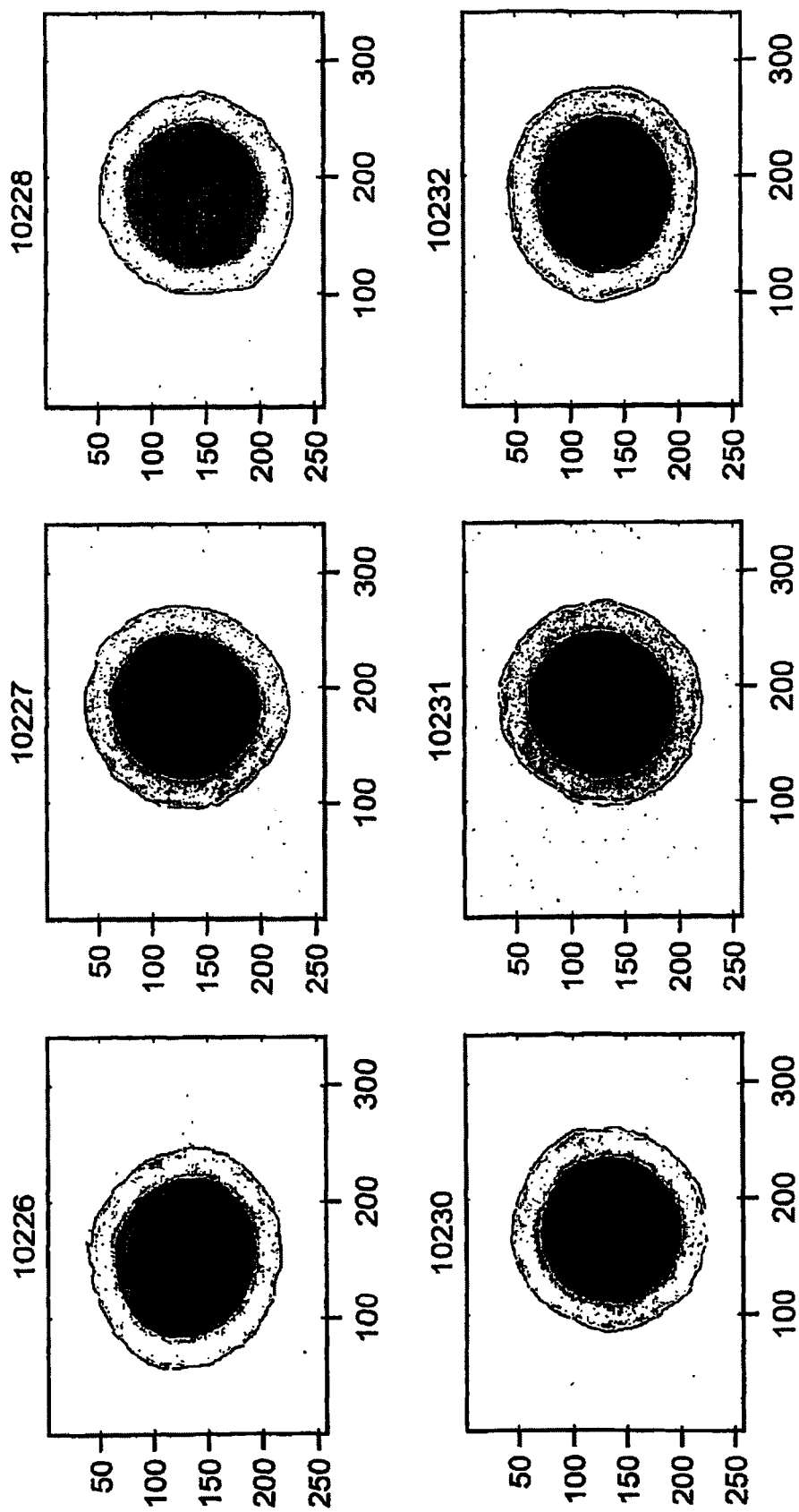


FIG.18

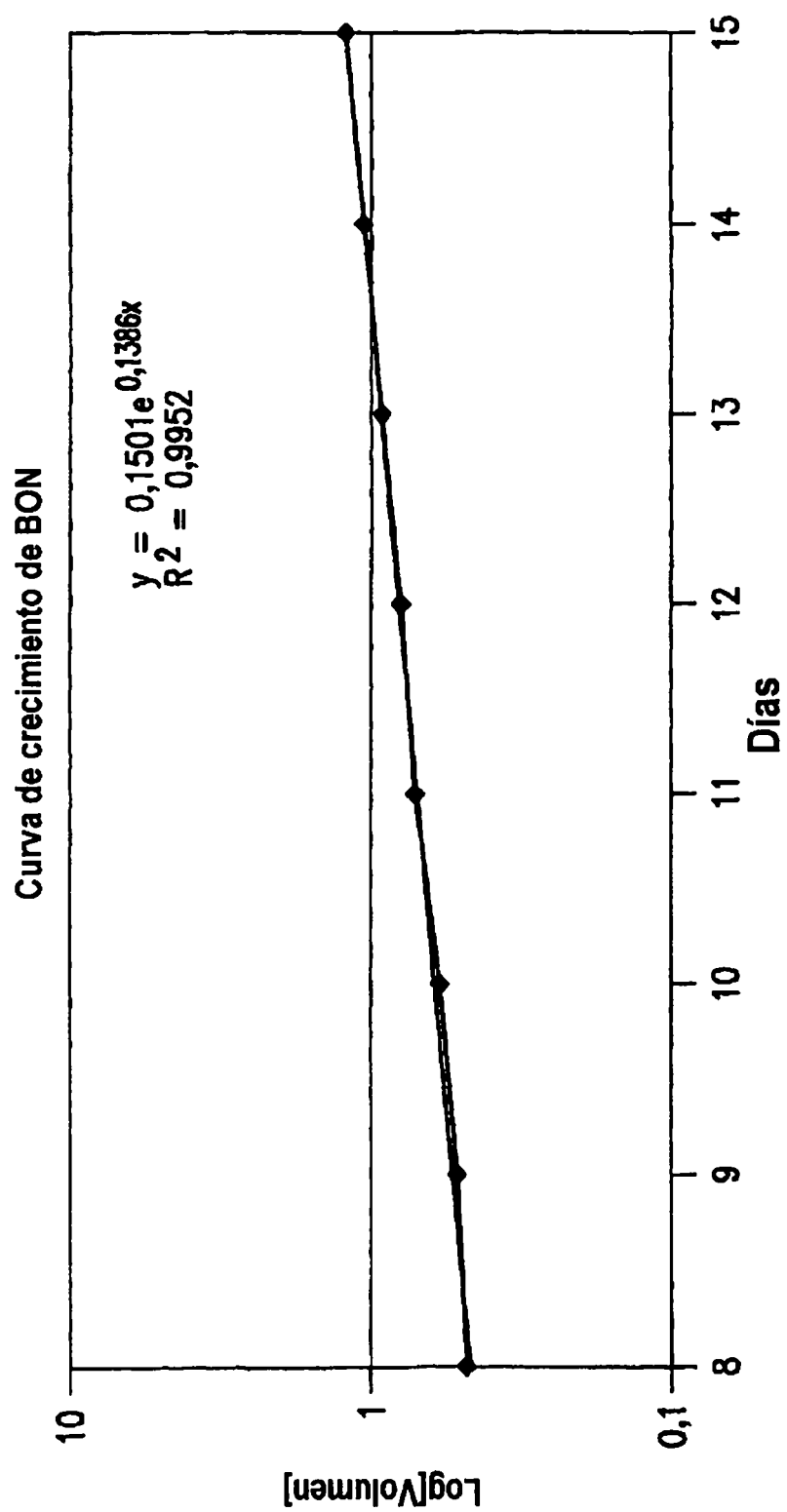


FIG.19

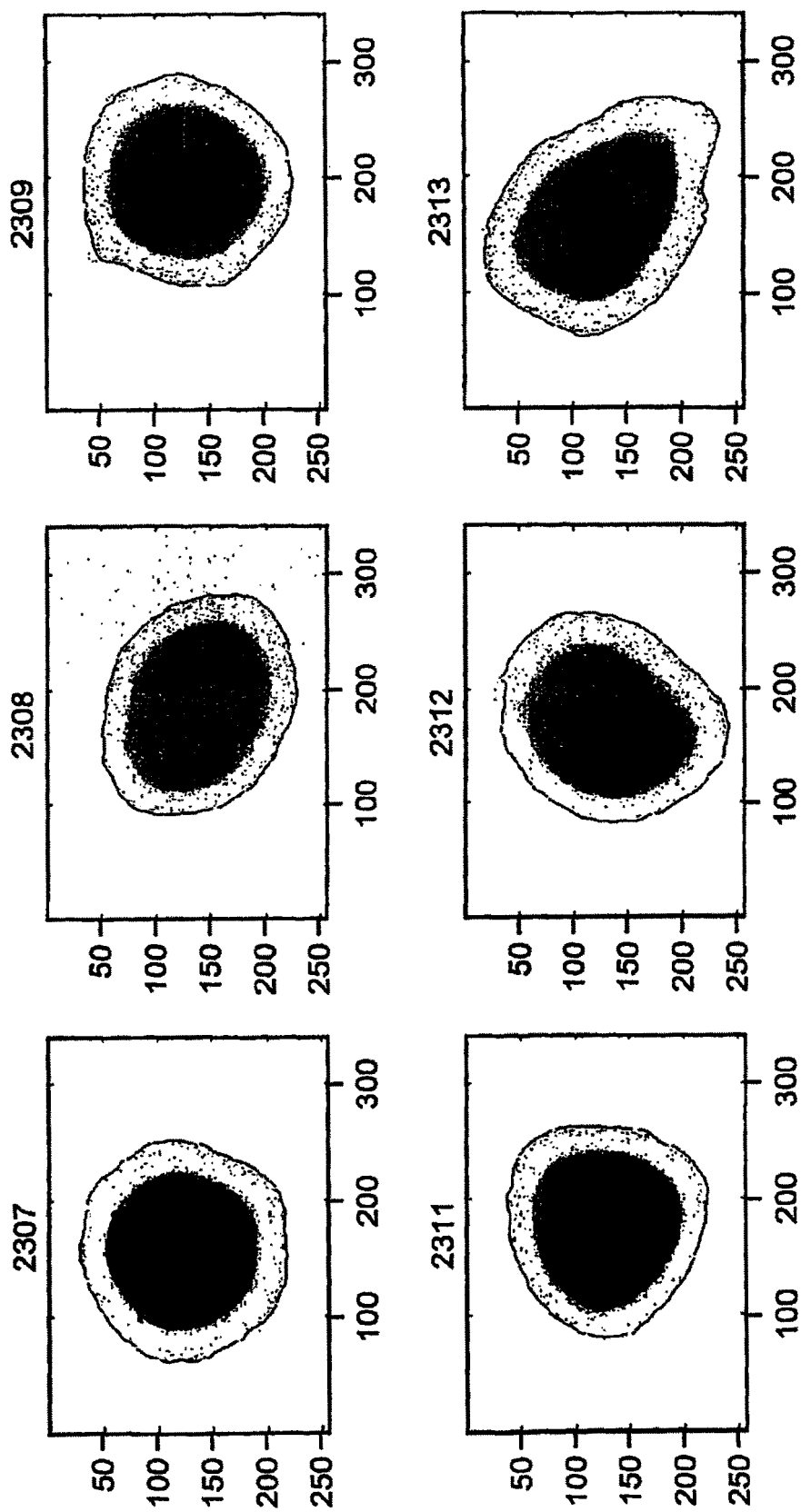


FIG.20

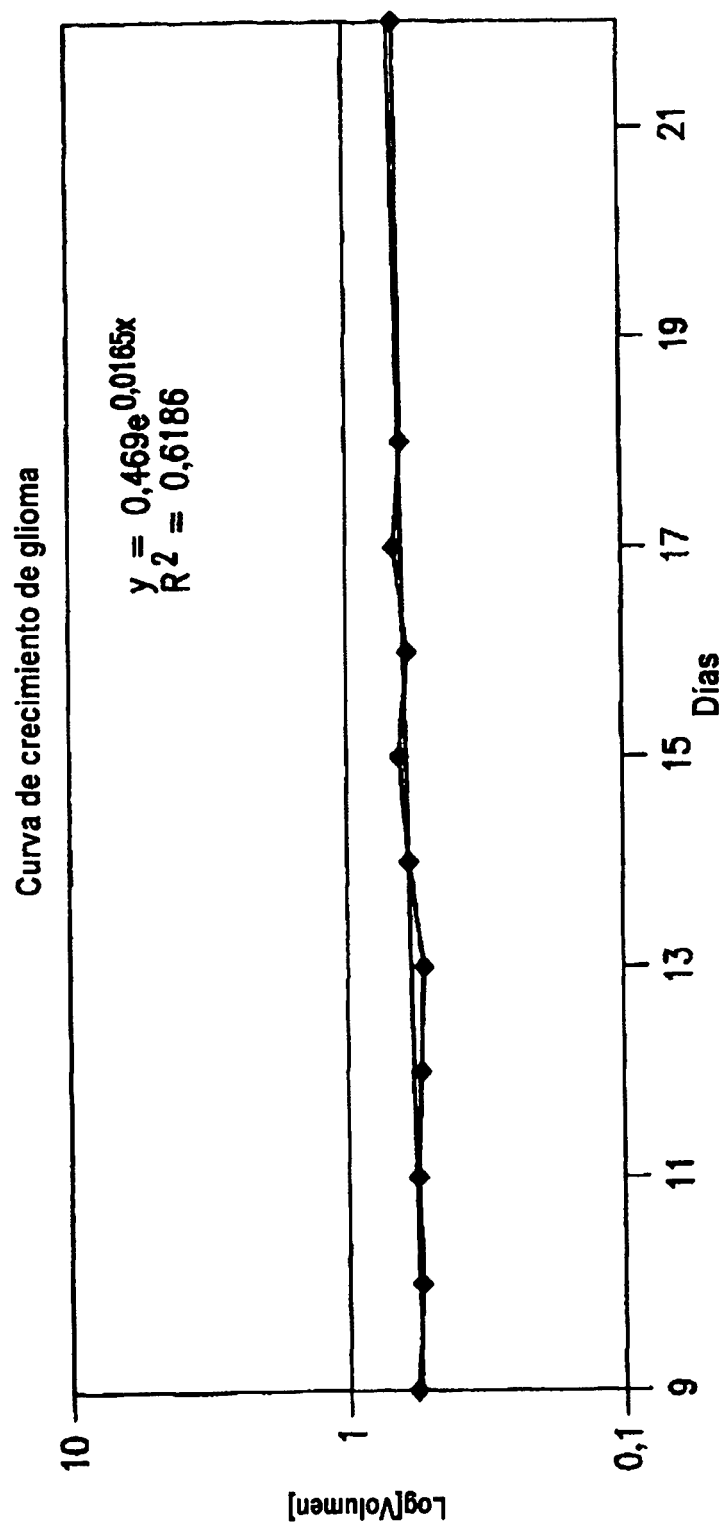


FIG.21

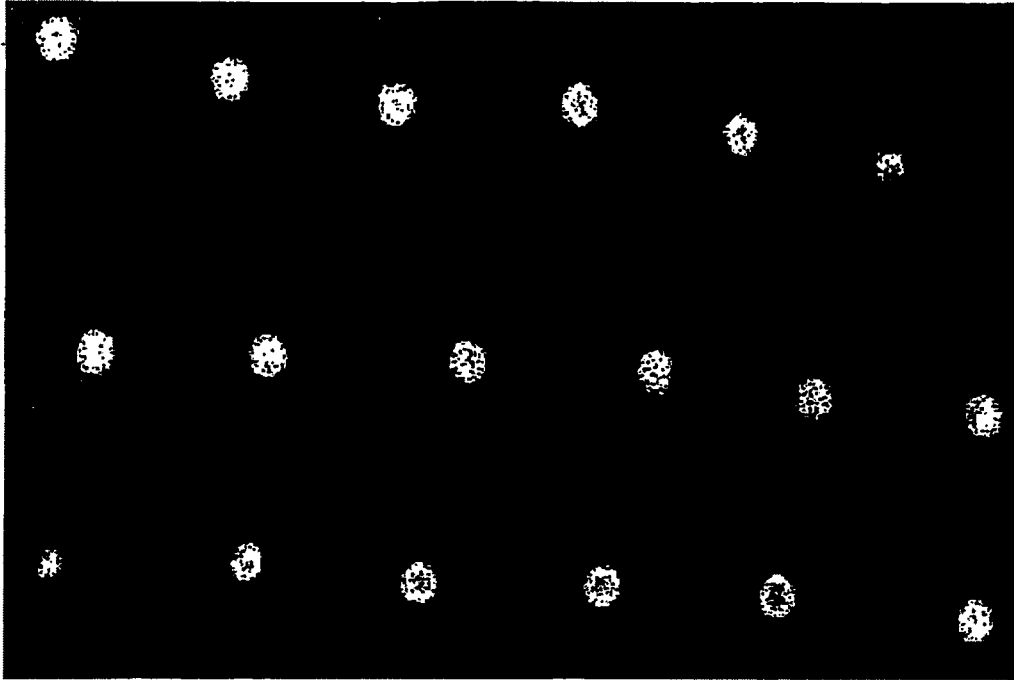


FIG.22

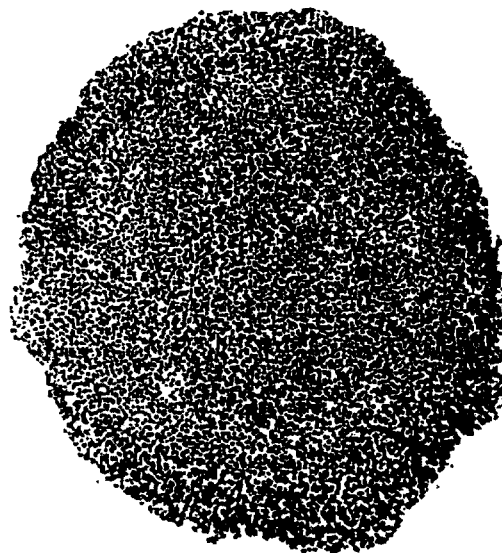


FIG.23