

Estudio *in vitro* sobre el cultivo de células madre mesenquimales derivadas de lipoaspirado en ambiente tumoral

NODO 8 TERCEL



Alicante Noviembre 2007

Dr. Damián García Olmo

PROYECTOS ACTUALES

- Ensayo Clínico Fase III.
- Uso compasivo de Terapia Celular en problemas de cicatrización
- Ensayos pre-clínicos con Biosuturas.
- Posible uso clínico alogénico de Células Mesenquimales.
- Bioseguridad de Células Madre Mesenquimales.

Exposición de los estudios de bioseguridad (in vitro) de las células madre mesenquimales derivadas de lipoaspirado (ASC)

Estudios de bioseguridad

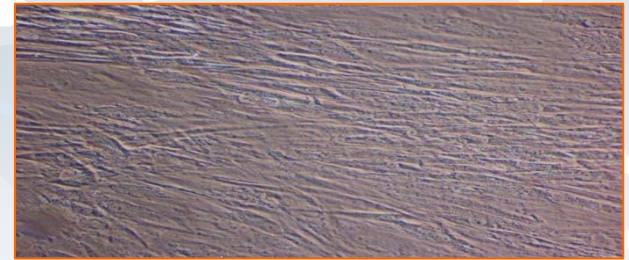
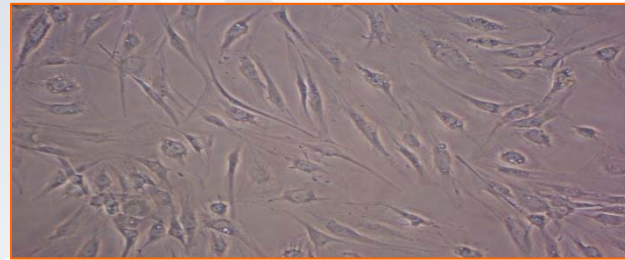
¿Pueden transformarse las MSC (ASC)?

ASCs

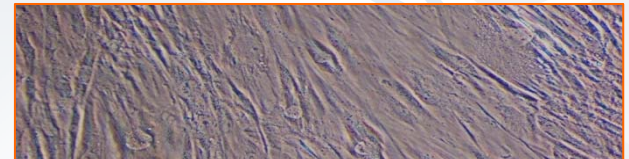
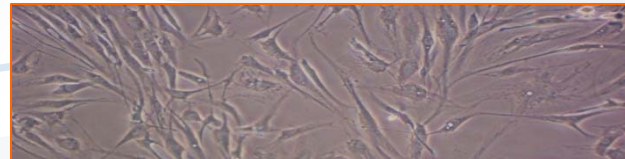
Primer día

Mas de 90 días

Cultivo con medio estandar

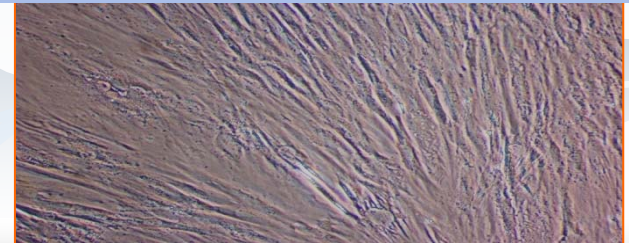
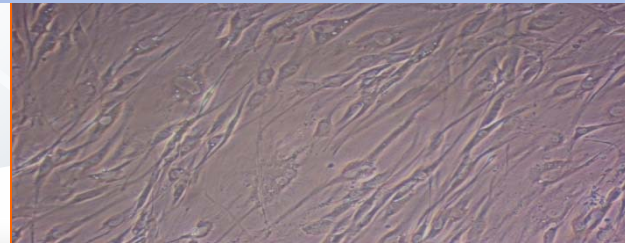


+ DNA Tumoral



Las MSCs de la grasa son muy estables

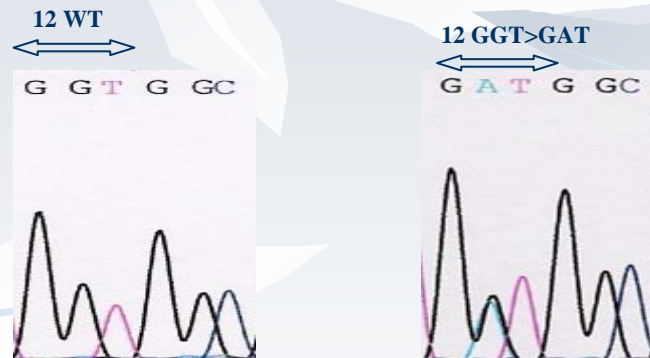
+ DNA plasma tumoral



MAS ESTRÉS...

MATERIAL DE PARTIDA

- Extracción y secuenciación del ADN tumoral de tumores frescos de una serie de pacientes con Cáncer Colorrectal (mutación conocida).
- Selección de pacientes que portaban mutación GGT>GAT en codón 12 de exón 1 del oncogén Kras .



- **Controles:** Extracción y secuenciación de ADN de tejido de pacientes con cáncer de colon sin mutación en Kras y buffy coat de pacientes sin patología tumoral.
- **Células:** ASC (células madre mesenquimales humanas derivadas de lipoaspirado) y NIH3T3 (fibroblastos de ratón).

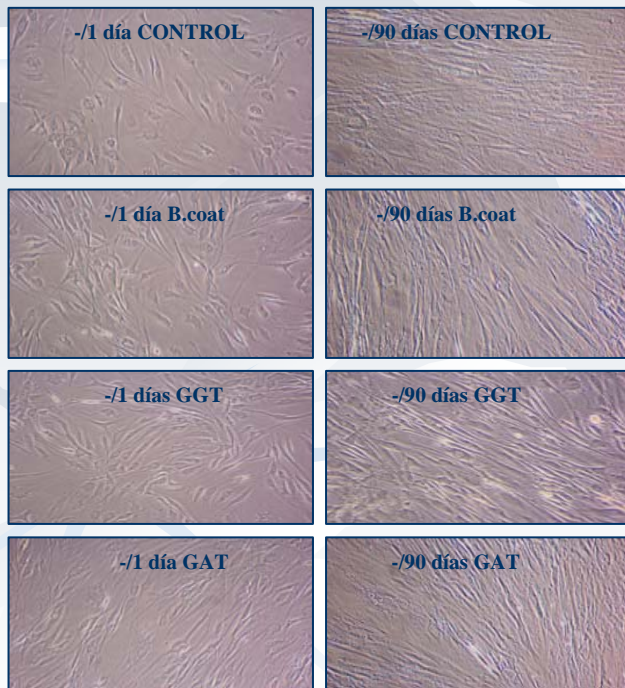
EXPERIMENTOS REALIZADOS

- Transfección células ASC y NIH3T3 con ADN tumoral \pm mutación y ADN no tumoral. Protocolo fosfato cálcico. Mantenimiento y seguimiento de los cultivos celulares.
- PCR en tiempo real con sondas FRET (*Fluorescent Resonance Energy Transfer*) específicas para la mutación. Análisis de mutaciones puntuales.

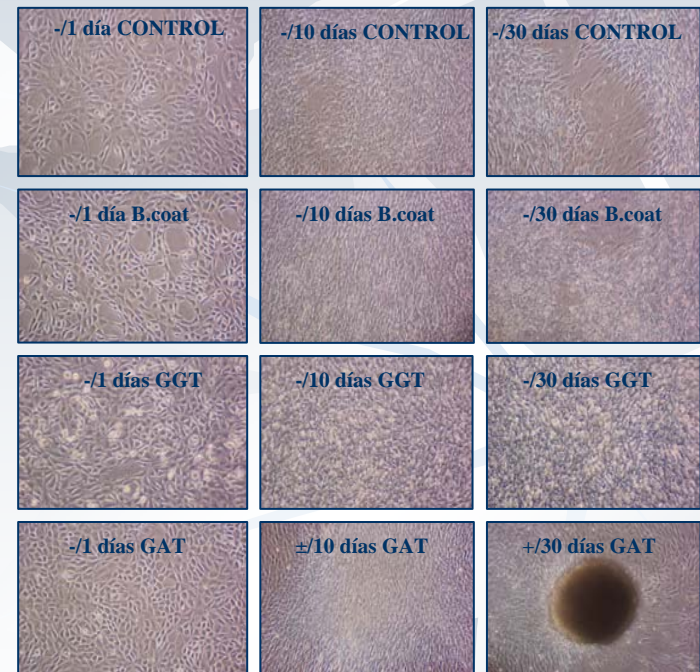
RESULTADOS I

SEGUIMIENTO CULTIVOS CELULARES: ESTUDIOS MORFOLÓGICOS

ASC

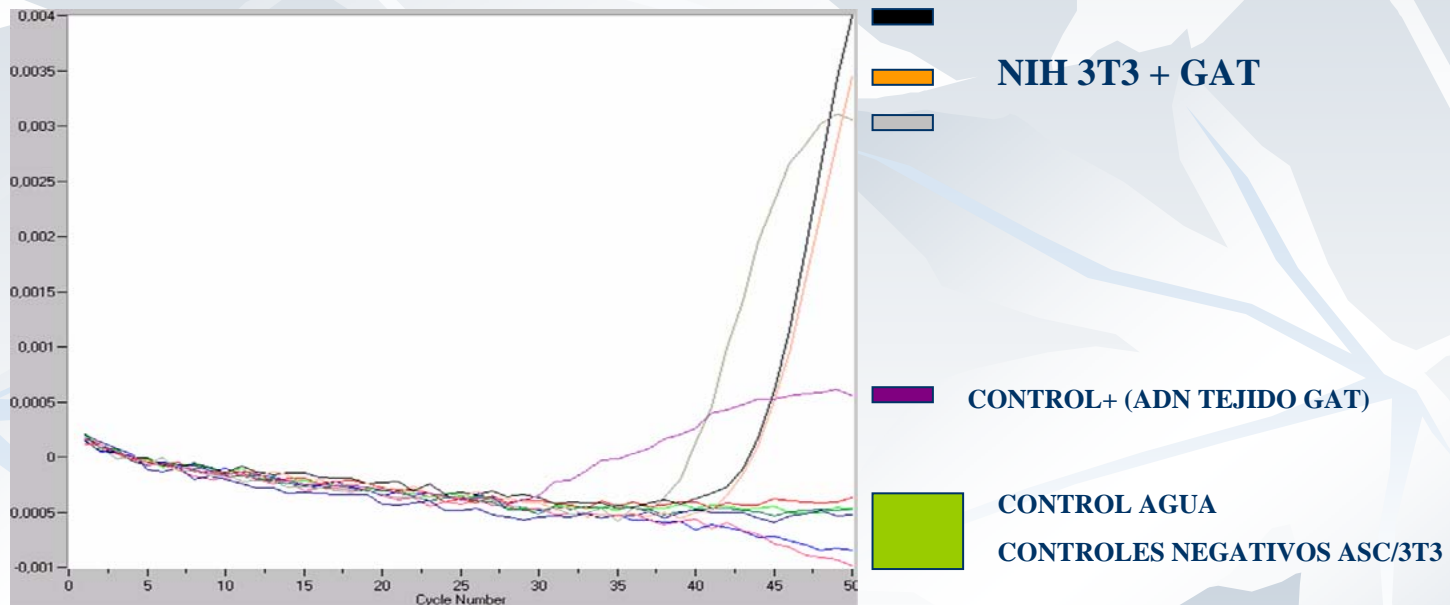


NIH3T3



RESULTADOS II

ANÁLISIS MUTACIONES POR PCR a tiempo real con sondas FRET (*Fluorescent Resonance Energy Transfer*).



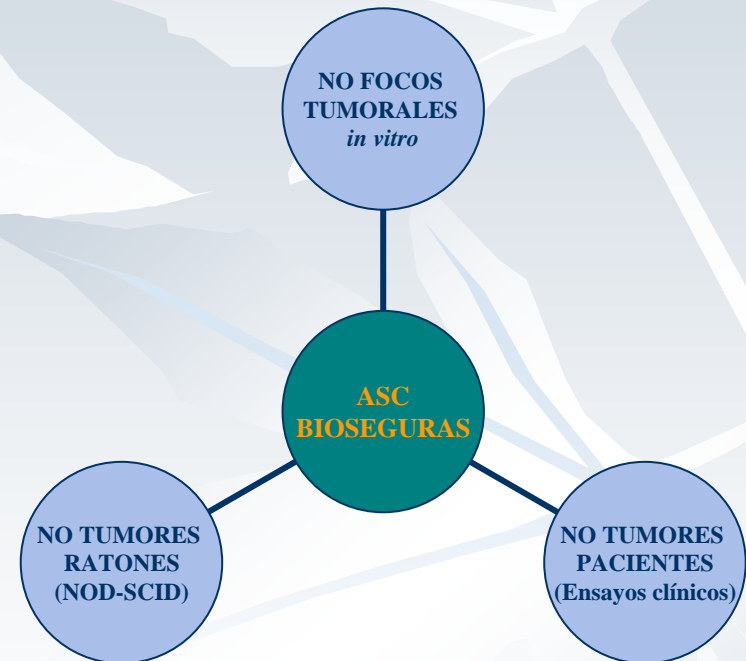
CONCLUSIONES

In vitro

- Las células ASC no forman focos tumorales *in vitro* al ser transfectadas con ADN tumoral con oncogenes conocidos .
- No se detecta la mutación al hacer análisis con PCR a tiempo real.

In vivo

- Inoculación de células ASC (control) en ratones NOD-SCID . No tumores en ningún órgano del ratón con ASC a los 50, 60 y 80 días.
- 5 años de seguimiento clínico de los pacientes a los que se han inyectado células ASC.



ESTUDIOS ACTUALES

- Completar experimentos transfecciones celulares

ASC	1	2	3	4	5
GGT	-	-	-		
GAT	-	-	-	-	-
GTT	-				
Buffy coat	-	-	-	-	-

3T3	1	2	3	4	5
GGT	-	-	-	-	-
GAT	+	+	+	+	+
GTT	+	M	M	X	X
Buffy coat	-	-	-	-	-

- Detección de Kras mutado (GAT, GTT y TGT) en PLASMA de pacientes con cáncer de colon mediante PCR a tiempo real.
- Cultivos de células ASC y NIH3T3 con plasmas de pacientes con cáncer de colon (mutación+ en tumor primario).

ESTUDIOS PREVISTOS

- CONOCER si las ASC incorporan el DNA tumoral: Plásmidos, Apoptosis (Western blot, Inmunohistoquímica, Citometría de flujo).
- CONOCER el comportamiento en estas condiciones de otras SC
- ESTUDIAR la cooperación oncogénica.

- Detección Kras circulante en:
 1. En plasmas de pacientes.
 2. En el medio de cultivo de líneas celulares tumorales humanas de cáncer de colon (SW-480, SW-620).
- Inyectar células tumorales (SW-480, SW-620) en ratones y detectar Kras en plasma Usar Caco-2 como células control.

- Cuantificación real de copias mutada/ μ g DNA transfectado.

¡GRACIAS!

