



OBTENCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES INMADURAS DE ORIGEN NEURONAL MEDIANTE SdFFF (Sedimentation Field Flow Fraction)

Paula Lazcoz *, Gaëlle Gribaud **, Serge Battu **, Phillipe Cardot **, Javier S. Castresana ***

* Universidad Pública de Navarra ESPAÑA

** Universidad de Limoges FRANCIA

*** Universidad de Navarra ESPAÑA

Resumen

Introducción

El estudio de las células madre como posible terapia para el tratamiento de distintas enfermedades es hoy en día uno de los campos de investigación más importantes.

La obtención de células madre o células inmaduras (no diferenciadas) provenientes de distintos tejidos, tumores o líneas celulares tumorales permite estudiar mejor la progresión tumoral e incluso en un futuro diseñar nuevas estrategias terapéuticas contra ciertos tipos de cáncer. Dentro del campo de investigación de las células madre se está comenzando a hablar de las células madre tumorales, como aquellas células inmaduras que pueden rescatarse del tumor y que serían las responsables del origen y mantenimiento del mismo. Así se han definido ya las células BTSC (brain tumor stem cells) obtenidas de glioblastomas, y las "células inmaduras neuronales" obtenidas de neuroblastomas.

La SdFFF es un método de separación basado en los principios de la cromatografía. En función de las propiedades físicas de las células (tamaño, densidad y forma) esta técnica permite separar los distintos tipos celulares manteniendo íntegras sus cualidades y su viabilidad, sin necesidad de marcar las células ni someterlas a ningún tratamiento previo a la separación.

Material

El estudio se llevó a cabo sobre la línea celular de neuroblastoma IMR-32. Esta línea celular fue obtenida originalmente a partir de un neuroblastoma abdominal de un niño de 13 meses. Morfológicamente está formada por dos tipos celulares diferentes: células con morfología neuroblástica y células con morfología fibroblastoidea.

Metodología

- Separación de las distintas subpoblaciones celulares mediante SdFFF.
- Marcaje por inmunohistoquímica para caracterizar las distintas fracciones celulares obtenidas tras SdFFF y verificar que se han conseguido separar las células inmaduras de aquellas más diferenciadas. Se utilizaron los marcadores celulares de inmadurez y diferenciación Fas y NCAM respectivamente.
- Marcaje por citometría de flujo de Fas y NCAM para confirmar los resultados obtenidos por inmunohistoquímica.

Resultados

Se obtuvieron tres fracciones celulares diferentes, con las siguientes características:

- Fracción 1: células pequeñas redondeadas que formaban aglomerados celulares, expresaban Fas y no NCAM, por lo que eran células inmaduras.
- Fracción 2: ambos tipos celulares.
- Fracción 3: predominaban las células con morfología fibroblastoidea, las cuales no expresaban Fas pero sí NCAM, es decir, eran células más diferenciadas.

Conclusiones

- 1- La técnica de SdFFF nos permite obtener células inmaduras tumorales de origen neuronal.
- 2- Las células redondeadas inmaduras con morfología neuroblástica obtenidas en la fracción 1 daban lugar a las células con morfología fibroblastoidea lo que sugiere que actuarían como células madre tumorales siendo las responsables del origen y mantenimiento del tumor.

Introducción

El estudio de las células madre como posible terapia para el tratamiento de distintas enfermedades es hoy en día uno de los campos de investigación más importantes.

La obtención de células madre o células inmaduras (no diferenciadas) provenientes de distintos tejidos, tumores o líneas celulares tumorales permite estudiar mejor la progresión tumoral e incluso en un futuro diseñar nuevas estrategias terapéuticas contra ciertos tipos de cáncer. Dentro del campo de investigación de las células madre se está comenzando a hablar de las células madre tumorales, como aquellas células inmaduras que pueden rescatarse del tumor y que serían las responsables del origen y mantenimiento del mismo. Así se han definido ya las células BTSC (brain tumor stem cells) obtenidas de glioblastomas, y las "células inmaduras neuronales" obtenidas de neuroblastomas (1-6).

La SdFFF (sedimentation field flow fractionation) es un método de separación similar a la cromatografía. Basándose en las propiedades físicas de las células (tamaño, densidad y forma) esta técnica permite separar los distintos tipos celulares manteniendo íntegras sus cualidades y su viabilidad. El principio fundamental de esta técnica consiste en una elución diferencial de las células en un líquido (fase móvil) que transcurre por un canal. Los distintos tipos celulares dependiendo de sus características físicas responden de distinta manera a la aplicación de una fuerza de gravedad mayor que la de la Tierra, aplicada esta perpendicularmente a la dirección del flujo de la fase móvil. En función de esta respuesta las células migran a distintas velocidades a lo largo del canal y son recogidas a distintos tiempos. De este modo las células más pequeñas y de mayor densidad salen en primer lugar, mientras que las células de mayor tamaño y menor densidad son retenidas durante más tiempo y salen las últimas (7-10).

Material y Métodos

Material

El estudio se llevó a cabo sobre la línea celular de neuroblastoma IMR-32. Esta línea celular fue obtenida originalmente a partir de un neuroblastoma abdominal de un niño de 13 meses. Morfológicamente está formada por dos tipos celulares diferentes: células con morfología neuroblásticas y células con morfología fibroblastoídea.

Metodología

- Separación de las distintas subpoblaciones celulares mediante SdFFF. Las condiciones de separación fueron: 10g; 1,2 ml/min; 4.10⁶ células.
- Marcaje por inmunohistoquímica para caracterizar las distintas fracciones celulares obtenidas tras SdFFF y verificar que se han conseguido separar las células inmaduras de aquellas más diferenciadas. Se utilizaron los marcadores celulares de inmadurez y diferenciación Fas y NCAM respectivamente.
- Marcaje por citometría de flujo de Fas y NCAM para confirmar los resultados obtenidos por inmunohistoquímica.

Resultados

Se obtuvieron tres fracciones celulares diferentes, con las siguientes características:

- Fracción 1: células pequeñas redondeadas que formaban aglomerados celulares, expresaban Fas y no NCAM, por lo que eran células inmaduras.
- Fracción 2: ambos tipos celulares.
- Fracción 3: predominaban las células con morfología fibroblastoídea, las cuales no expresaban Fas pero si NCAM, es decir, eran células más diferenciadas.

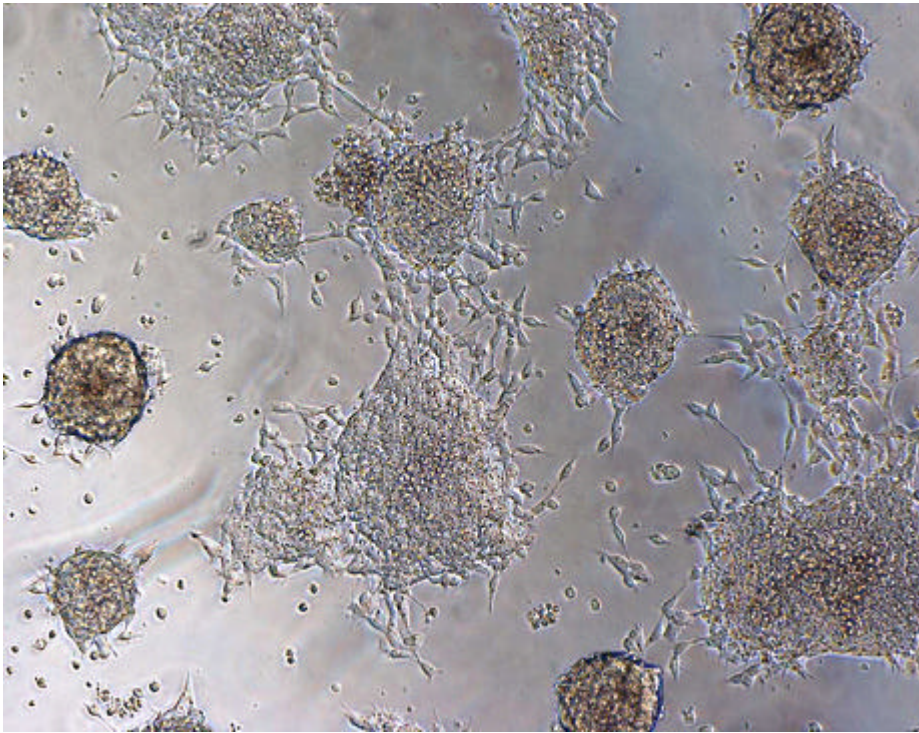


Figura 1 - Línea celular obtenida a partir de una masa tumoral abdominal de un niño de 13 meses. Características : NB con algunas zonas diferenciadas de apariencia « organoide » Amplificación de MYCN, delección del cromosoma 1p... Morfología : 2 tipos celulares diferentes: - Células esféricas, morfología similar a la de los neuroblastos - Células fibroblasto ideas

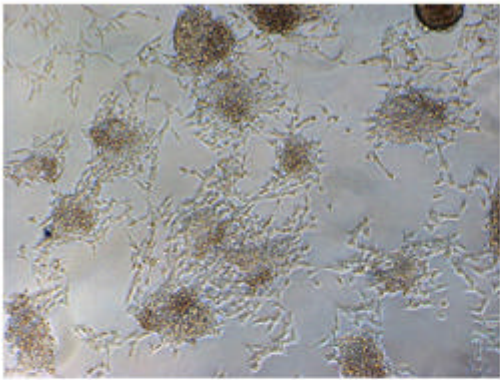
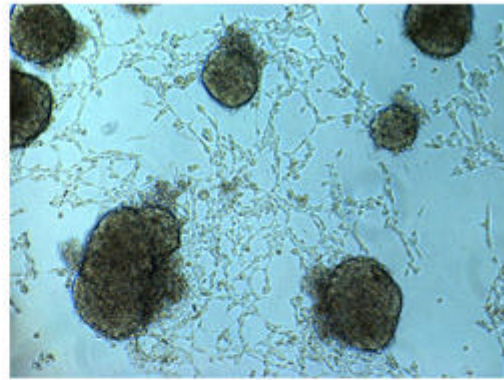
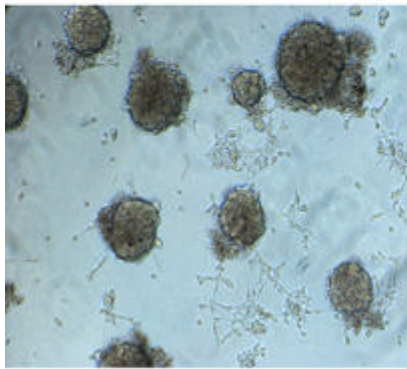
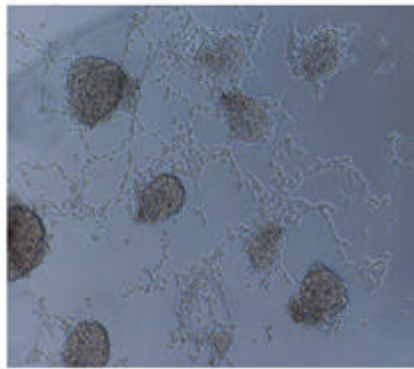
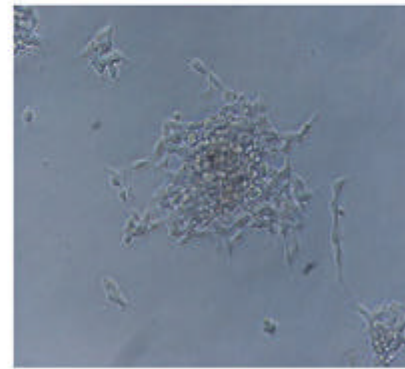
96 horas de cultivo tras FFF**Crude extract****Total peak****F1****F2****F3**

Figura 2 - Separación celular mediante SdFFF. Se obtienen tres fracciones celulares diferentes: una de células redondeadas neuroblastoides, otra de células fibroblastoides, y otra en la que se entremezclan los dos tipos celulares.

Immunofluorescencia: marcaje N-CAM

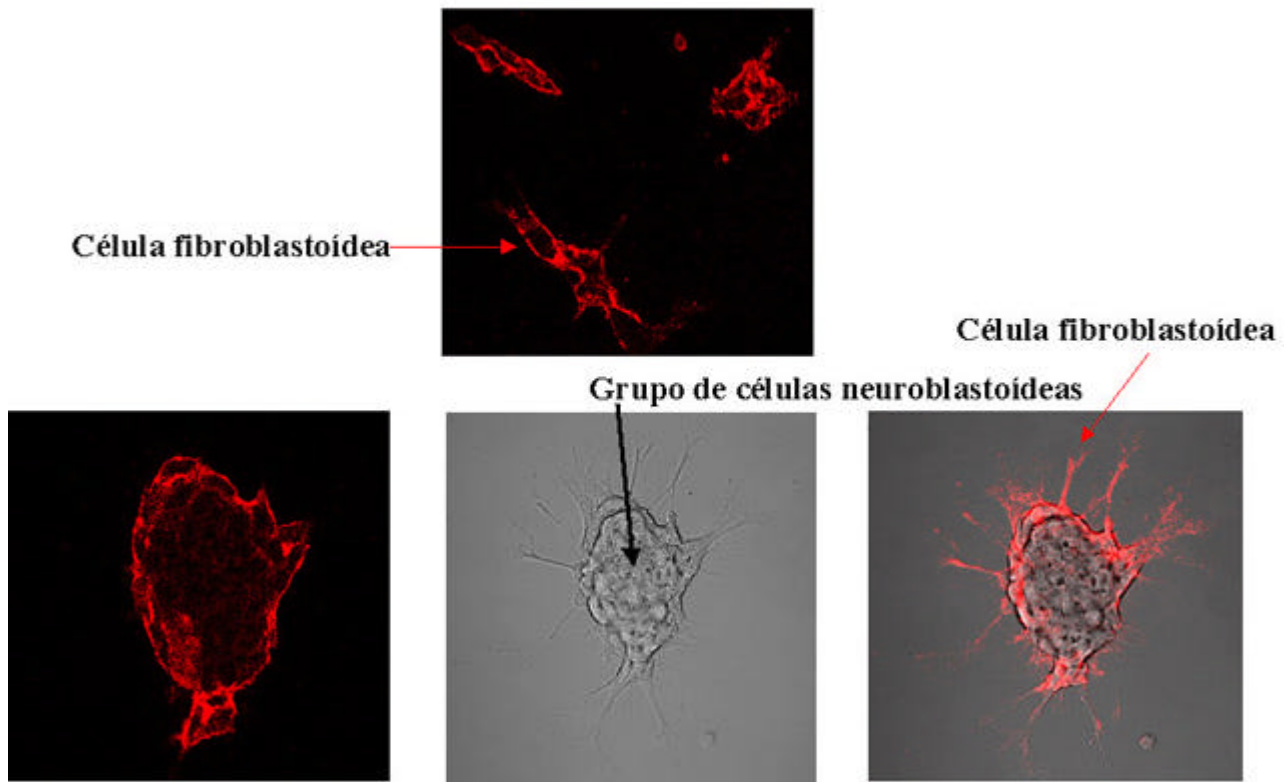


Figura 3 - Las células fibroblastoideas se muestran N-CAM +, mientras que las neuroblastoideas no expresan N-CAM.

Immunofluorescencia: marcaje Fas

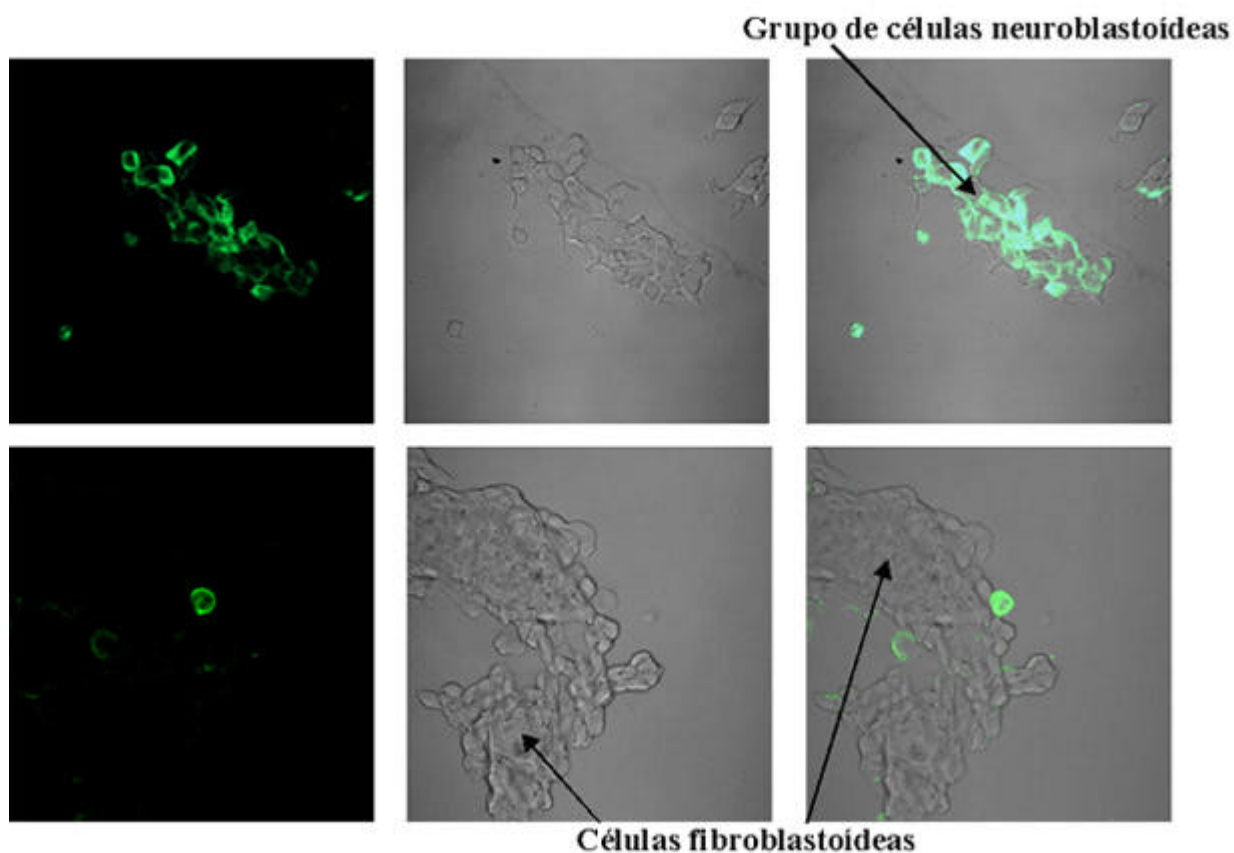


Figura 4 - El grupo de células neuroblastoideas se marcan positivamente con Fas, mientras que las células fibroblastoideas no expresan Fas.

Conclusiones

- 1- La técnica de SdFFF nos permite obtener células inmaduras tumorales de origen neuronal.
- 2- Las células redondeadas inmaduras con morfología neuroblástica obtenidas en la fracción 1 daban lugar a las células con morfología fibroblastoídea lo que sugiere que actuarían como células madre tumorales siendo las responsables del origen y mantenimiento del tumor.

Bibliografía

1. Aboody, K.S., Brown, A., Rainov, N.G., Bower, K.A., Liu, S., Yang, W., Small, J.E., Herrlinger, U., Ourednik, V., Black, P.M., Breakefield, X.O. & Snyder, E.Y. (2000). Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 12846-51.
2. Bazan, E., Alonso, F.J., Redondo, C., Lopez-Toledano, M.A., Alfaro, J.M., Reimers, D., Herranz, A.S., Paino, C.L., Serrano, A.B., Cobacho, N., Caso, E. & Lobo, M.V. (2004). In vitro and in vivo characterization of neural stem cells. *Histol Histopathol*, 19, 1261-75
3. Brown, A.B., Yang, W., Schmidt, N.O., Carroll, R., Leishear, K.K., Rainov, N.G., Black, P.M., Breakefield, X.O. & Aboody, K.S. (2003). Intravascular delivery of neural stem cell lines to target intracranial and extracranial tumors of neural and non-neural origin. *Hum Gene Ther*, 14, 1777-85

4. Singh, S.K., Clarke, I.D., Hide, T. & Dirks, P.B. (2004). Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene*, 23, 7267-73.
5. Yip, S., Aboody, K.S., Burns, M., Imitola, J., Boockvar, J.A., Allport, J., Park, K.I., Teng, Y.D., Lachyankar, M., McIntosh, T., O'Rourke, D.M., Khoury, S., Weissleder, R., Black, P.M., Weiss, W. & Snyder, E.Y. (2003). Neural stem cell biology may be well suited for improving brain tumor therapies. *Cancer J*, 9, 189-204.
6. Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J. & Dirks, P.B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 63, 5821-8.
7. Metreau, J.M., Gallet, S., Cardot, P.J., Le Maire, V., Dumas, F., Hervann, A. & Loric, S. (1997). Sedimentation field-flow fractionation of cellular species. *Anal Biochem*, 251, 178-86.
8. Assidjo, E., Chianea, T., Dreyfuss, M.F. & Cardot, P.J. (1998). Validation procedures of sedimentation field -flow fractionation techniques for biological applications. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 709, 197-207.
9. Battu, S., Roux, A., Delebasee, S., Bosgiraud, C. & Cardot, P.J. (2001). Sedimentation field-flow fractionation device cleaning, decontamination and sterilization procedures for cellular analysis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 751, 131-41.
10. Lautrette, C., Cardot, P.J., Vermot-Desroches, C., Wijdenes, J., Jauberteau, M.O. & Battu, S. (2003). Sedimentation field flow fractionation purification of immature neural cells from a human tumor neuroblastoma cell line. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 791, 149-60.