

CULTIVO DE MICROESFEROIDES 3D PARA ESTUDIOS DE PLURIPOTENCIALIDAD TUMORAL EN LÍNEAS RENALES HUMANAS

Tamara Eliana Barnes*, Juan Pablo Rodríguez, Gabriela Beatriz Olea, Juan Pablo Melana Colavita, María Victoria Aguirre

Facultad de Medicina – Universidad Nacional del Nordeste
Correo electrónico: tamaraelianabarnes@gmail.com

RESUMEN

El carcinoma de células renales (CCR) constituye el cáncer urológico más letal, representa el 2-3% de todos los tumores y es la lesión sólida más frecuente en el riñón adulto. Dentro del grupo heterogéneo que engloba el CCR un 70-80% de éstos incluye el Carcinoma Renal de Células Claras (CRCC). Reciente evidencia sugiere que muchas enfermedades malignas son impulsadas por un fracción celular que muestra propiedades de células madre en las denominadas células madre cancerígenas (CSC). Para lograr la identificación de esta subpoblación celular se ha desarrollado una metodología fenotípica alternativa basada en la formación de esferas in vitro. En este estudio, como análisis preliminar, se seleccionaron varias líneas celulares de RCC (Caki-2, Caki-1 y ACHN) y células renales de origen embrionario (HEK-293) fueron empleadas como línea celular control. En ésta última mencionada, se formaron estructuras 3D exitosamente con aumento progresivo de tamaño durante todo el tiempo de ensayo pero de las tres líneas tumorales renales ensayadas (Caki-1, Caki-2 y ACHN), solo Caki-1 pudo formar esferas 3D estables, aunque sin crecimiento tridimensional a largo plazo.

PALABRAS CLAVES: Células madre, Cáncer Renal, Esferas 3D.

ABSTRACT

Renal cell carcinoma (RCC) is the most lethal urological cancer, representing 2-3% of the total of tumours and is the most common solid injury in the adult kidney. Within the heterogeneous group that includes RCC, 70-80% of these involve the Renal Carcinoma of Clear Cells (CRCC). Recent findings suggest that many malignancies are driven by a cellular compartment that displays stem cell properties called cancer stem cells (CSCs). To achieve the identification of this cellular subpopulation an alternative phenotypic methodology based on the formation of in vitro spheres has been developed. In this study, as a preliminary analysis, several RCC cell lines (Caki-2, Caki-1 and ACHN) were selected and the control was from embryonic kidney cells (HEK-293) were performed as a control cell line. HEK-293 cell line formed 3D structures successfully with progressive increase in size during the entire experimental time and what concerns to the three renal tumour lines tested (Caki-1, Caki-2 and ACHN), although only Caki-1 could form stable 3D spheres, it was without long-term three-dimensional growth.

KEY WORDS: Stem Cells, Renal Cancer, 3D Spheroids

INTRODUCCION

Uno de los carcinomas sólidos más intrigantes en su desarrollo es el carcinoma de células renales (CCR). Éste constituye el cáncer urológico más letal, representa el 2-3% de todos los tumores y es la lesión sólida más frecuente en el riñón adulto⁷. El carcinoma renal engloba a un grupo heterogéneo de subtipos tumorales que incluye al Carcinoma Renal de Células Claras (CRCC), responsable de un 70-80% de todos los carcinomas renales cuya incidencia en los últimos años se ha incrementado, en particular en países desarrollados, sin embargo, su mortalidad, no ha sufrido grandes variaciones.

Hallazgos recientes indican que la recurrencia de la enfermedad y la posterior metástasis podrían estar mediados por una pequeña subpoblación anómala de células tumorales denominadas células madre cancerígenas (CSC), que jugarían un papel crítico en la progresión del cáncer por sus características peculiares en términos de adhesión, crecimiento y metabolismo lo que le permite ser mediadores activos a nivel del desarrollo tumoral, de la diseminación metastásica y de la resistencia al tratamiento⁶. Las CSC se caracterizan por el potencial de diferenciación de autorenovación y multilinaje que, al igual que las células madre de tejidos normales, siguen organizaciones jerárquicas y tienen la capacidad de tumorigénesis, promoción de la metástasis y la resistencia a la quimioterapia o radioterapia⁴.

El ensayo más ampliamente utilizado para el aislamiento de CSC se basa en la capacidad de formar colonias flotantes o "esferas" debido a que pueden sobrevivir en condiciones independientes de anclaje, probablemente debido a la activación constitutiva de la quinasa de adhesión focal (FAK) en estas células². Esto indica que, su supervivencia y proliferación en suspensión es porque son

resistentes a una apoptosis inducida por la pérdida de anclaje de la célula a la matriz extracelular o porque las interacciones célula-matriz son insuficientes o inapropiadas¹ ya que células que no tienen características de células madres no sobreviven. Por otra parte, la creación de una tercera dimensión para el cultivo celular es más relevante para la fisiología in vivo y nos permite comprender la biología del cáncer en la etapa más temprana del desarrollo del mismo accediendo a nuevos modelos de crecimiento de cáncer de células renales y con ello permitir investigaciones tendientes a acceder al desarrollo de nuevos objetivos terapéuticos⁵.

OBJETIVOS

Examinar fenotípicamente la pluripotencia en líneas renales humanas mediante el empleo del cultivo de microesferas celulares 3D como una técnica favorable para la simulación de las condiciones in vivo del desarrollo tumoral.

MATERIAL Y METODOS

Cultivos Celulares

Líneas celulares humanas renales embrionarias HEK-293(ATCC® CRL-1573™), primarias de cáncer renal Caki-2 (ATCC® HTB47™) y metastásicas Caki-1 (ATCC® HTB46™) y ACHN (ATCC® CRL1611™) se cultivaron en iguales condiciones en medios DMEM/F12 y RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10% (SFB) (Hyclone), bicarbonato de sodio, penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) en botellas T75 de cultivo de células según protocolos estándar en condiciones normóxicas de cultivos de mamíferos (atmósfera humidificada de 5% de CO₂ y 37°C). Ambas líneas celulares renales humanas se subcultivaron al menos una vez después de la descongelación, hasta alcanzar aproximadamente una monocapa de 90 % de confluencia y luego se sometieron a tripsinización (solución de tripsina-EDTA al 0,25%; GIBCO) para su despegue y uso en los posteriores experimentos.

Ensayo de Formación de Esferoides

Las células resuspendidas se lavaron dos veces con PBS para eliminar cualquier medio restante con SFB. Se cultivaron en suspensión con medio suplementado con SFB^{3,8}.

Tras conteo celular en hemocitómetro, la siembra se ajustó a una densidad de 10.000 células/ml en placas de 96 pocillos en forma de U no adherentes con 100µL por pocillo de RPMI 1640 o DMEM/F12 suplementados con antibióticos (100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin), SFB al 10% y 1% y bicarbonato de sodio.

Para un primer experimento, las líneas celulares HEK 293, Caki-1, Caki-2 y ACHN se cultivaron durante 4 días, en el medio descrito previamente mientras que en un segundo experimento, las líneas celulares HEK-293 y Caki-1 se cultivaron durante 7 días, renovando el medio de cultivo dos veces durante ese período.

Durante el desarrollo de ambos experimentos se tomaron fotos de los esferoides de todos los días de cultivo, usando un microscopio de luz invertida con un aumento de 5X. Para el análisis cuantitativo, los esferoides formados se contaron a partir de seis campos microscópicos representativos utilizando el software ISCapture. Finalmente, el diámetro de las esferas individuales se midió usando el software ImageJ y el correspondiente análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó considerando un promedio de mediciones de los diámetros. Los valores se expresan en promedio ± desviación estándar (DE) de un experimento con un número constante de células.

RESULTADOS

Se logró verificar el potencial que poseen varias líneas celulares renales para crear agregados sólidos en condiciones normóxicas y en presencia o ausencia de suero fetal bovino (SFB). La Figura 1 presenta los cambios en la morfología agregada de la línea celular renal embrionaria HEK-293 durante 4 días de cultivo en condiciones normóxicas con diferentes concentraciones de suero (1% y 10%). Esta misma metodología, permitió registrar el tiempo y las variaciones ocurridas para la creación de agregados sólidos de las otras líneas celulares ensayadas (Gráfico 1).

La línea celular derivada de tumor primario de carcinoma de células renales (Caki-2) y de una línea de carcinoma renal proveniente de un sitio metastásico (ACHN) no pudieron crear agregados sólidos con ninguno de los medios con diferentes concentraciones de SFB (Figura 2).

En otro experimento, comparando el desarrollo de los esferoides correspondientes a las líneas celulares HEK-293 y Caki-1, ambos lograron crecer hasta el séptimo día de cultivo, pero en el caso de la línea metastásica el tamaño se mantuvo sin variaciones (Figura 3).

FIGURA 1

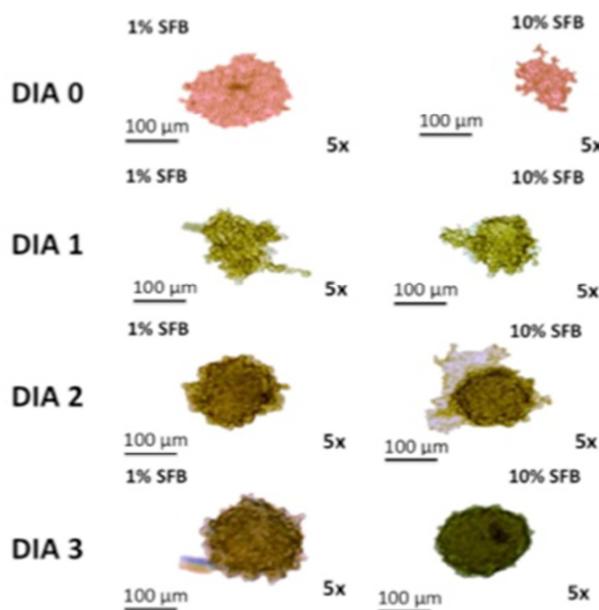


Figura 1. Imagen representativa de la influencia en la agregación en la línea celular renal embrionaria HEK-293 debido a la variación en la concentración de SFB (1% y 10%) en el medio de cultivo. Medición realizada con aumento 5X y escala de 100 μm.

GRAFICO 1

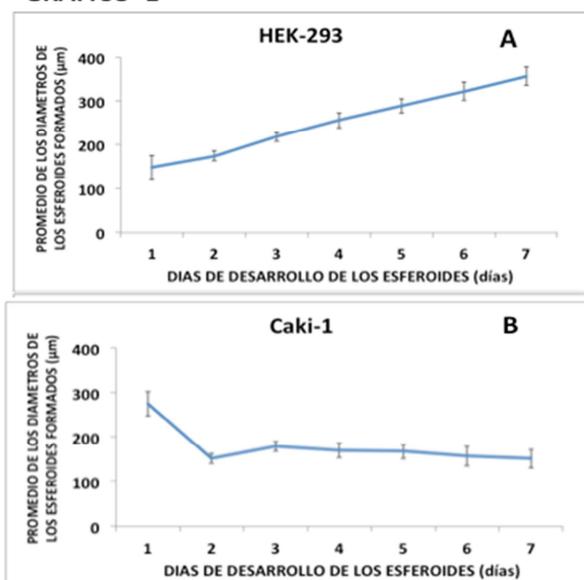


Gráfico 1. Representación gráfica de la evolución del diámetro de las esferas formadas a partir de las líneas celulares renales embrionaria y tumoral metastásica HEK-293 (A) y Caki-1 (B), respectivamente, durante los siete días de crecimiento. Los datos representan la media ± desviación estándar (DE) de un experimento con un número constante de células.

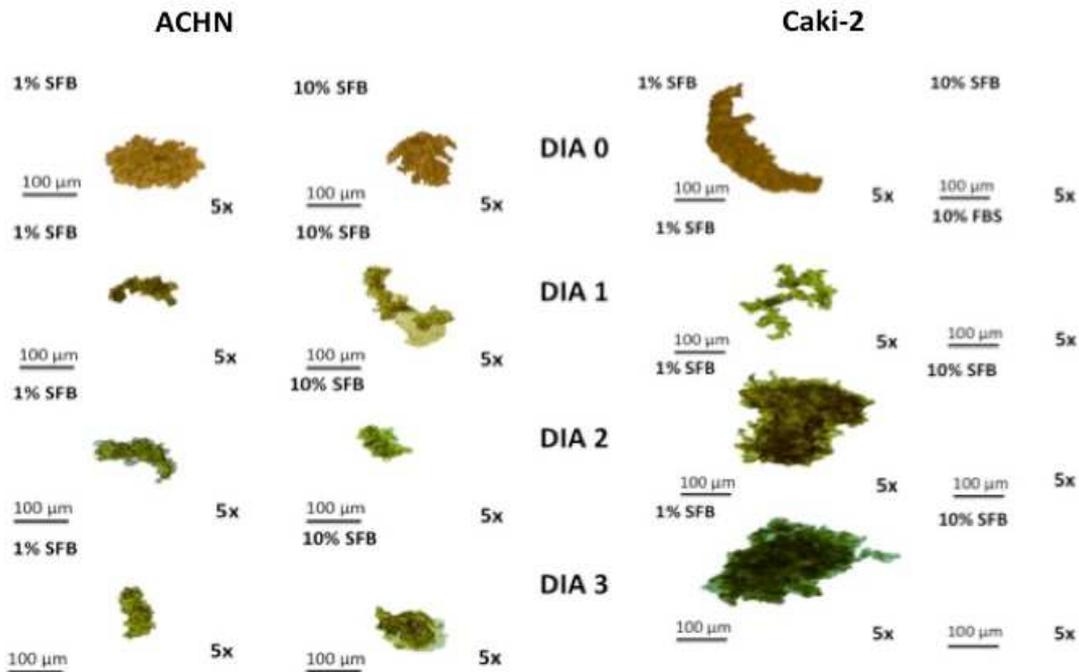


Figura 2. Imagen representativa de la influencia en la agregación en la línea celular metastásica y primaria ACHN y Caki-2, respectivamente debido a la variación en la concentración de SFB (1% y 10%) en el medio de cultivo. Medición realizada con aumento 5X y escala de 100 μm.



Figura 3. Imagen representativa del crecimiento durante el periodo de siete días de las líneas celulares renales embrionaria y tumoral metastásica HEK-293 y Caki-1, respectivamente debido a la variación en la concentración de SFB (1% y 10%) en el medio de cultivo. Medición realizada con aumento 5X y escala de 100 μm.

DISCUSION Y CONCLUSION

De las cuatro líneas celulares renales estudiadas, una embrionaria (HEK-293) y tres líneas tumorales renales ensayadas (Caki-1, Caki-2 y ACHN), solo HEK-293 y Caki-1 formaron esferas 3D estables, aunque sólo la primera con aumento progresivo de tamaño durante todo el tiempo de ensayo ya que en la línea metastásica no hubo crecimiento tridimensional a largo plazo, revelando que conserva autoagregación, con una posible pluripotencialidad limitada.

La técnica de cultivo y evaluación de microesferas celulares 3D parecen ser más favorables para la simulación de las condiciones in vivo que los sistemas 2D convencionales para los experimentos básicos de pluripotencialidad y para estudios de condiciones microambientales para el desarrollo tumoral. Esto permitió evidenciar diferentes rasgos característicos de cada línea celular en estudio de acuerdo a su potencial proliferativo y de adherencia permitiendo inferir el posible carácter de célula madre tumoral.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brodaczevska KK, Szczylik C, Fiedorowicz M, Porta C, Czarnecka AM. Choosing the right cell line for renal cell cancer research. *Molecular Cancer*. 2016; 15 (1): 83.
2. Chen YC, Ingram PN, Fouladdel S, McDermott SP, Azizi E, Wicha MS, Yoon E. High-Throughput Single-Cell Derived Sphere Formation for Cancer Stem-Like Cell Identification and Analysis. *Sci Rep*. 2016; 6.
3. Corradi S., Dakou E, Yadav A, Thomassen LCJ, Kirsch-Volders M, Leyns L. Morphological observation of embryoid bodies completes the in vitro evaluation of nanomaterial embryotoxicity in the embryonic stem cell test (EST). *Toxicology in Vitro*. 2015; 29:1587–1596.
4. Lemma S, Avnet S, Salerno M, Chano T, Baldini N. Identification and Validation of Housekeeping Genes for Gene Expression Analysis of Cancer Stem Cells. *PLoS ONE*. 2016; 11(2): e0149481.
5. Matak D, Brodaczevska KK, Lipiec M et al. Colony, hanging drop, and methylcellulose three dimensional hypoxic growth optimization of renal cell carcinoma cell lines. *Cytotechnology*. 2017; 69:565–578.
6. Matak D, Brodaczevska KK, Szczylik C, Koch I, Myszczyzyn A, Lipiec M, Lewicki S, Szymanski L, Zdanowski R, Czarnecka AM. Functional significance of CD105-positive cells in papillary renal cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2017;17 (1): 21.
7. Valente MJ, Henrique R, Costa VL, Jeronimo C, Carvalho F, Bastos ML, de Pinho PG, Carvalho M. A rapid and simple procedure for the establishment of human normal and cancer renal primary cell cultures from surgical specimens. *PLoS One*. 2011;6(5):e19337.
8. Ying Q, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*. 2003; 115, 281–292.