



Artículo Original

Optimización de cultivos primarios de células de carcinoma renal de células claras como modelo “in vitro” para estudios metabólicos y determinantes de progresión neoplásica

Melana, Juan Pablo,; Rodríguez, J.P.; Stoyanoff, T.R.; Espada, J.D.; Todaro, J.S.; Aguirre, M.V.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue optimizar la implementación de cultivos primarios a partir de muestras de carcinoma renal de células claras (CRCC) para comprobar la conservación del fenotipo lipogénico contra cortes fijados del mismo origen.

Se utilizaron muestras de pacientes con CRCC, evaluándose diversas metodologías y condiciones experimentales de digestión de muestras, adherencia y despegue celular, fenotipo lipogénico, potencial de clonación, proliferación y capacidad de migración. El mayor rendimiento y viabilidad celular se verificó mediante digestión con colagenasa. La adherencia inicial se logró a las 24 hs de incubación, utilizando placas plásticas de cultivo, recubiertas con colágeno comercial y gelatina 0,2% en la mayoría de las muestras analizadas (60% de los casos). Se obtuvieron monocapas, con potencial de migración, en un 40% de los casos, tras 5 ± 1 días de incubación. El promedio de subcultivos fue de 3 ± 1 . Este estudio permitió estandarizar cultivos primarios de CRCC comprobándose la conservación de la fenotipia lipogénica, logrando de dicha manera una herramienta importante y útil para el estudio de la biología tumoral y el ensayo de nuevas terapéuticas.

Palabras clave: Cultivos primarios tumorales; carcinoma renal; optimización técnica; lipogénesis.

SUMMARY

The aim of this study was to optimize the implementation of primary cultures from samples of renal clear cell carcinoma (CRCC) to check the conservation of the lipogenic phenotype.

CRCC Patient samples were used, in order to evaluate different methodologies and the experimental conditions of sample digestion, cell adhesion and lipogenic phenotype, proliferation and migration ability. The highest yield in cell number and viability was assessed using collagenase digestion. The initial adhesion was achieved after 24 hours of incubation in plastic plates recovered with commercial collagen or 0.2% gelatin (60% of cases). Monolayers, with migration potential, were obtained in 40% of all cases, after 5 ± 1 days of incubation. The subcultures average was 3 ± 1 . This study allowed us to standardize primary cultures of CRCC and check the conservation of the lipogenic phenotyping, achieving in this way an important and useful tool to study the tumor biology.

Keywords: Tumor primary cultures; renal carcinoma; technical optimization; lipogenesis.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi otimizar a implementação de culturas primárias de amostras de carcinoma de células claras renal (CRCC) para verificar conservação fenótipo lipogenic contra os cortes previstos a mesma origem.

As amostras dos pacientes foram utilizados CRCC, avaliando diferentes metodologias e as condições experimentais da digestão de amostras, adesão celular e fenótipo clonagem potencial take-lipogenic, proliferação e capacidade de migração. O maior rendimento e a viabilidade celular foi avaliada por digestão com colagenase. A adesão inicial foi obtida após 24 horas de incubação com colágeno e gelatina comercial 0,2% em 60% dos casos. As monocamadas foram obtidos em 40% após 5 ± 1 dias de incubação com o potencial de migração. As subculturas média foi de 3 ± 1 . Este estudo nos permitiu padronizar culturas primárias de CRCC são verificados quanto à conservação da fenotipagem lipogenic, conseguindo desta forma um importante e útil para o estudo da biologia do tumor e teste de nova ferramenta terapêutica.

Palavras-chave: Culturas primárias de tumores; carcinoma renal; otimização técnica; lipogênese.



INTRODUCCION

El carcinoma de células renales (CCR), es el más común de los tumores malignos en el riñón adulto. Aproximadamente el 33% de todos los pacientes tienen metástasis en la presentación de la enfermedad, y al 40% de los pacientes que se les practica la resección quirúrgica, eventualmente desarrollan metástasis. El CCR posee características clínicas únicas, como ser la metástasis tardía post cirugía curativa y una alta resistencia a la radioterapia y quimioterapia convencionales. Debido al incremento en la detección de tumores con el uso de técnicas de imagen no invasiva, se encuentran un número creciente de CCR incidentales. Entre los subtipos histológicos más frecuentes de CCR el Carcinoma renal de células claras (CRCC) es el más frecuente (80-90%). Hasta el momento, resulta dificultoso predecir el pronóstico basado solamente en factores tales como el estadio, el grado de crecimiento, o la respuesta terapéutica a la administración de antiangiogénicos. Es así como hay una fuerte necesidad de mayor conocimiento básico de los procesos celulares subyacentes (proliferación, diferenciación, apoptosis, etc.) como de nuevos agentes terapéuticos basados en modelos que reflejen o se aproximen a la situación tumoral. Para ello, los cultivos celulares primarios, generados a partir de muestras humanas obtenidas de cirugía, ofrecen contar con la disponibilidad de gran número de células y permitir varios tipos de experimentos repetidos a lo largo de prolongados periodos de tiempo^{1,2}.

Por otro lado, el uso de líneas inmortalizadas tiene una limitación importante con respecto a los cultivos primarios partiendo de la base de que son genéticamente alteradas y sufren desdiferenciación tras sucesivos pasajes in vitro, perdiendo así las características iniciales^{3,4}. Por el contrario, los cultivos primarios poseen y conservan las características fenotípicas del tejido original, incluyendo las funciones normales fisiológicas en los tejidos sanos, como las características fenotípicas alteradas en los tumorales.

Estos modelos de cultivos in vitro son muy útiles en análisis de mecanismos moleculares para posteriores aplicaciones, identificación de biomarcadores, estudios metabólicos, genómica, transcriptómica, proteómica o lipidómica y testeo de drogas⁵⁻⁷. Además, el cultivo proveniente de diferentes individuos permite al investigador generar conclusiones de mayor validación al comparar estudios de diferentes orígenes.

Los cultivos primarios de CRCC han sido descriptos en numerosos trabajos, con diversas especificaciones técnicas de implementación y rendimiento disímil^{4,8-10}. Sin embargo, hasta la fecha no se dispone de un protocolo unificado con buenos rendimientos, lo que sustenta la presente investigación.

El desarrollo de este estudio permitió establecer un modelo experimental in vitro de cultivos primarios de tejidos renales tumorales, a partir de muestras de pacientes diagnosticados con CRCC sometidos a nefrectomía radical, como herramienta para explorar aspectos metabólicos de la biología tumoral.

Material y método.

1. Evaluación clínico-patológica y procesamiento de las muestras

Se trabajó con 36 tumores provenientes de pacientes diagnosticados con CCR con nefrectomía radical o parcial del Servicio de Urología del Hospital J.R. Vidal (Corrientes). Se cumplieron las normas Bioéticas Nacionales (Disposición ANMAT 5330/97) e internacionales (Declaración de Helsinki).



El presente plan cuenta con la aprobación del Dpto. de Investigación del Hospital J.R. Vidal y el aval del Dpto. de Bioética de la Facultad de Medicina-UNNE. Las muestras tumorales como las de control (tejido renal normal distal) fueron fraccionadas en una porción para la realización de los cultivos primarios y el resto se destinó para ensayos en paralelo incluidos en los diferentes proyectos relacionados (fraccionamiento subcelular para inmunoblottings, extracción de ARNm, TUNEL in situ, inmunohistoquímicas y/o inmunofluorescencia indirecta). La estadificación (TNM) y graduación nuclear de Fuhrman se realizaron en su mayoría en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital J.R. Vidal (Corrientes), incorporando información referente a datos clínico-patológicos tales como sexo, edad y tamaño del tumor.

2. Implementación del cultivo primario:

Se aplicó el método descrito por Valente y colaboradores¹⁰ ajustando variables técnicas a nuestras condiciones experimentales para la optimización y rendimiento del cultivo. Cabe mencionar que en todo momento se trabajó en condiciones de esterilidad, utilizando una campana de flujo laminar horizontal de aire estéril y materiales esterilizados.

2.1. Aislamiento

El aislamiento de las células tumorales se realizó inmediatamente de su resección quirúrgica dentro de los 30 minutos (min), transportándose las muestras en medio de cultivo incompleto Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-F12) marca Sigma®, suplementado con antibióticos (penicilina 50 U/ml y estreptomycin 50 ug/ml) y antimicótico (anfotericina B 2,5 ug/ml) en condiciones refrigeradas. Se procedió a la remoción de restos necróticos, coágulos y tejido fibroso en placas de Petri de 60 milímetros (mm). Los trozos de tejido se cortaron con bisturí hasta lograr fragmentos de 1 mm³ y se lavaron varias veces con solución fría fisiológica suplementada con antibióticos y antimicótico. Luego, los pequeños fragmentos se digirieron en 3 condiciones diferentes: 1 mg/ml colagenasa (Sigma®) en Buffer de digestión HBSS (pH=7,6), tripsina 0,25% y tripsina más colagenasa; en todos los casos se resuspendió en tubos pre-entibiados con el medio de cultivo DMEM-F12. Se realizó una incubación de 20 min a 37°C con agitación suave permanente. Se efectuaron dos lavados con posterior centrifugación a 400g 5 min a 4°C para luego resuspender las células en medio de cultivo.

2.2. Cultivo celular

Previo al cultivo se determinó la viabilidad y la celularidad con Trypan Blue (0,4%) a través de microscopía óptica en cámara de Neubauer. Las células aisladas (105 cél/ml) se sembraron en placas de 6 wells y en frascos de cultivo (75 cm²) recubiertos con distintos adherentes: colágeno comercial 40 g/ml, colágeno purificado y gelatina 0,2 % P/V, incubando en estufa gaseada 5% CO₂ a 37°C. El medio de cultivo completo utilizado fue DMEM-F12 suplementado con 10% suero fetal bovino, glutamina 5 ug/ml, transferrina 5 ug/ml y los antibióticos y antimicótico ya mencionados en las mismas concentraciones. El medio de cultivo se renovó a las 24 hs y se controló el crecimiento con microscopio óptico registrando el mismo fotográficamente. Se dejó que el cultivo alcance el 80% de confluencia antes de realizar un Subcultivo y/o criopreservación (1:10, Dimetilsulfóxido (DMSO) + medio de cultivo) en termo de nitrógeno líquido a -180°C.



2.3. Subcultivos (Determinación de capacidad de clonación).

Previo la remoción de la monocapa, dicha fue lavada con PBS tibio, acto siguiente se ensayaron diferentes métodos de despegue: a) Mecánico con scrapping (uso de escobillas), b) Reactivo de disgregación libre de enzimas animales y humanas TryPLE Express (Life Technologies®) y c) Tripsina al 0,25 % (Gibco®) con incubación a 37°C por 3 min, comprobando el desprendimiento celular mediante observación microscópica. La actividad de la tripsina proteasa se bloqueó agregando 10 ml de medio de cultivo suplementado. Tras varios lavados por centrifugación, las células se recultivaron ajustando la celularidad para su siembra.

3. Evaluación de la cinética de crecimiento de las células cultivadas (bioensayo de MTT)

La función metabólica de las células tumorales se evaluó con la sal de tetrazolio: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), que al reducirse por acción de las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables produce formazan púrpura, detectable colorimétricamente según técnica descrita por Mosmann y col.¹¹ Brevemente, las células tumorales se cultivaron por triplicado en placas de 24 wells. En todos los casos se colocó 5x10⁵ células/pocillo y se incubaron a 37°C y 5 % de CO₂ en estufa. Las placas se centrifugaron a diferentes tiempos a 1500 rpm y se removieron los sobrenadantes. Las microplacas se lavaron finalmente con PBS, para evitar interferencias de las proteínas del suero fetal en la dilución final del formazán¹². La monocapa se re suspendió en 700 ul de medio de cultivo sin suplementar y sin rojo fenol con 100 ul de MTT (5 mg/ml) y se incubaron nuevamente en las mismas condiciones por 4 hs adicionales. Finalizado este tiempo, se agregó 1 ml de etanol para disolver el colorante reducido y rápidamente con alícuotas de 300 ul se midió la absorbancia a 540 nm en espectrofotómetro (Jenway 7305®). Las absorbancias registradas se asumieron como medida indirecta de masa celular viable. Los resultados se correlacionaron con cuantificaciones de células en microplacas tomando 10 campos al azar durante varios días de observación hasta alcanzarse el 80% de confluencia con el uso del software Image J.

Se evaluó la cinética de crecimiento en la fase exponencial (fase log) y se determinó la constante de crecimiento (k) de cada cultivo primario, tomando como referencia los parámetros conocidos de una línea comercial cultivada en paralelo (HCT-116 ATCC CCL-247, k=0,028 y tiempo de duplicación de 21 hs).

4. Estudio del perfil lipogénico en células CCRC de cultivos primarios

4.1. Tinción con Red-Oil del contenido lipídico

Las células aisladas antes de cultivar y cultivadas hasta el 80% de confluencia fueron evaluadas en su contenido lipídico total. Brevemente, las células se fijaron con 10% de formalina incubando 10 min a temperatura ambiente. La formalina se removió y se procedió al lavado de las células 2 veces con 2 ml de agua destilada y luego con 2 ml de isopropanol al 60% por 5 min. Las células se dejaron secar completamente a temperatura ambiente y se tiñeron por 10 min a la misma temperatura con 1 ml de Oil Red O (previamente filtrado). Se removió el colorante y se lavó 4 veces con agua destilada. Luego, tras su secado, los portaobjetos se montaron con medio acuoso (glicerol/PBS) para su observación con microscopía óptica^{13, 14}.



4.2. Coloración de lipid-droplets con BODIPY

Para estos experimentos, las células se sembraron en cubreobjetos que fueron colocados en la parte inferior de platos de 6 pocillos en un volumen de 2 ml. Dichas células se fijaron 20 min con 1 ml de paraformaldehído al 4% en PBS que contenía 3% de sacarosa. Eliminado el fijador, las células se lavaron tres veces con PBS, y se llevaron a cabo dos tinciones fluorescentes incubando los preparados durante 10 min con 2 $\mu\text{g/ml}$ de BODIPY (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazo-s-indaceno, Thermo Scientific®) fluoróforo apolar indicado especialmente para detectar lipid droplets y 1 $\mu\text{g/ml}$ de DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol), compuesto fluorescente que se une fuertemente a regiones ricas en Adenina y Timina para contra-tinción nuclear.

Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos de microscopía con 25 μl de una solución de alcohol de polivinilo para su análisis por microscopía de fluorescencia. Se utilizó un microscopio de epifluorescencia Olympus CX31® con combinación de filtros (DAPI: 358/461 nm; BODIPY, 493/503 nm) registrando las imágenes fotográficamente. Las mismas fueron analizadas con el software Image-J fusionando los canales de emisión verdes y azules¹⁵.

5. Ensayo de migración (Scratch wound healing assay)

Este ensayo permite evaluar la migración y el crecimiento de células en cultivo cuantificando distancias y/o tiempos de sellado en la reparación de una brecha o corte realizado en una monocapa de cultivo¹⁶. Brevemente, las células se cultivaron hasta un 80% - 90% de confluencia en DMEM – F12 suplementado.

Sin cambiar el medio, se marcó una línea recta lenta cuidadosamente en la monocapa con punta de micropipeta de siembra a través del centro del pozo. La placa se lavó suavemente dos veces con medio para eliminar las células desprendidas, reponiendo con medio suplementado tibio. La brecha se monitoreó con registro fotográfico cada 12 hs de cultivo hasta el sellado total. La distancia de separación de los frentes celulares generados, se evaluó cuantitativamente con el uso del software Image J¹⁶.

6. Imágenes y análisis estadístico

Los resultados fueron analizados utilizando el Software INSTAT 3.0 y PRISM versión 4.0 (GraphPad Software, San Diego, California, U.S.A.), y se expresaron como la media \pm S.E.M., considerando significativo un $P < 0.05$. Los gráficos fueron realizados con mediante el uso del software Graph Pad Prism versión 4.0. Las imágenes digitalizadas de los preparados por microscopía óptica y de fluorescencia se procesaron con el software Adobe Phothoshop 8.0, las mediciones se realizaron con el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>)¹⁷.

Resultados.

1. Cultivos primarios y cinética de crecimiento

La Tabla 1 resume los resultados de las diferentes condiciones ensayadas, referentes al aislamiento, adherencia, despegue y pasajes efectivos de las células de cultivos primarios de CCRC. La mejor condición para el aislamiento de las células tumorales fue la digestión con colagenasa (1 mg/ml) durante 3 min a 37°C con agitación frecuente ($27,6 \pm 1,8 \times 10^6$ células / g de tumor).



Tabla 1. Optimización de condiciones de digestión, adherencia y despegue de monocapa

Condiciones ensayadas		Rendimiento
Digestión de muestras (N° células /g tumor)	Colagenasa (1 mg/ml)	$27,6 \pm 1,8 \times 10^6$
	Tripsina 0,25%	$12,5 \pm 2,3 \times 10^6$
	Tripsina + colagenasa	$11,7 \pm 1,6 \times 10^6$
Recubrimiento de placas (N° cultivos con células adherentes a las 24 hs)	Colágeno comercial (40 µg/ml)	11
	Colágeno purificado	9
	Gelatina 0,2% (p/v)	12
Despegue de monocapas (N° de subcultivos efectivos/ cultivos primarios totales y % viabilidad)	Tripsina 0,25% 3 min a 37°C	5/12 – 97 %
	Despegue mecánico (scrapping)	2/7- 72 %
	TryPLE Express®	4/9-96 %

El establecimiento de cultivo primario, considerado positivo si a las 24 hs se verificaba adherencia celular, se alcanzó en un 60% de los cultivos realizados. La adherencia óptima se logró con cobertura previa de las placas de cultivo con gelatina comercial estéril 0,2%. El 40% de éstos logró formar monocapas confluentes (80-90%) tras 5 ± 1 días de incubación. El promedio de pasajes con mantenimiento la cinética de crecimiento fue de 3 ± 1 . Las monocapas fueron levantadas con igual grado de rendimiento y viabilidad con Tripsina–EDTA durante 3 minutos a 37°C que con el uso del reactivo no enzimático TryPLE Express, siendo el proceso de levantamiento mecánico por scrapping causante de alta mortalidad. Los cultivos capaces de formar monocapas confluentes mostraron morfología (Figura 1) y cinética de crecimiento (Figura 2) similares.

La fase lag tuvo una duración de 3 ± 1 días, la fase log de 5 ± 2 días promedio; mientras que las fases *plateau* y de senescencia muy variables entre las diferentes muestras.

La evaluación de la cinética de crecimiento se ilustra en Figura 2.

Como se advierte la curva de crecimiento (Figura 2 A) se ajusta a una ecuación del tipo exponencial:

$$N = N_0 \cdot e^{kt} \quad (1)$$

No es el número inicial de células, t es el tiempo de crecimiento, N es el número de células al tiempo t y k es la constante de crecimiento. De la ecuación (1) puede deducirse el tiempo de duplicación de la población celular (t_d) según la expresión (2)

$$t_d = \ln 2/k = 0,69 / k \quad (2)$$

La Figura 2B muestra la ecuación lineal de donde se obtiene experimentalmente la constante de crecimiento para cada muestra tumoral. Se tomó como referencia una línea de k conocida y crecimiento de duplicación muy próximo al ideal ($R^2=1$).



Figura 1

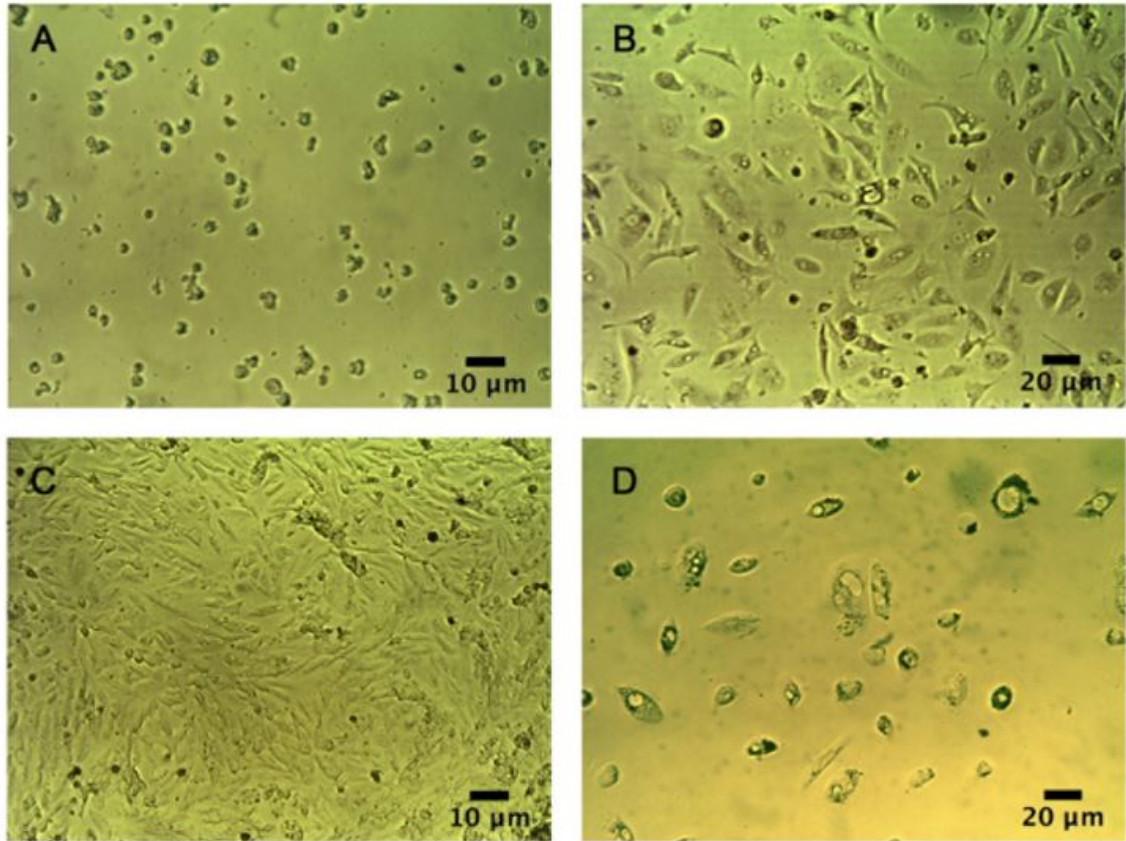
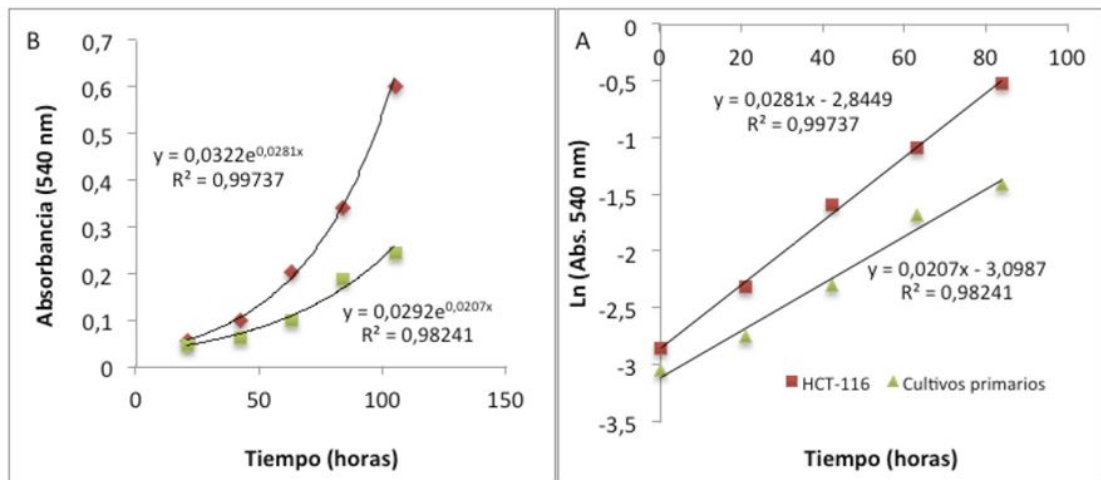


Figura 2

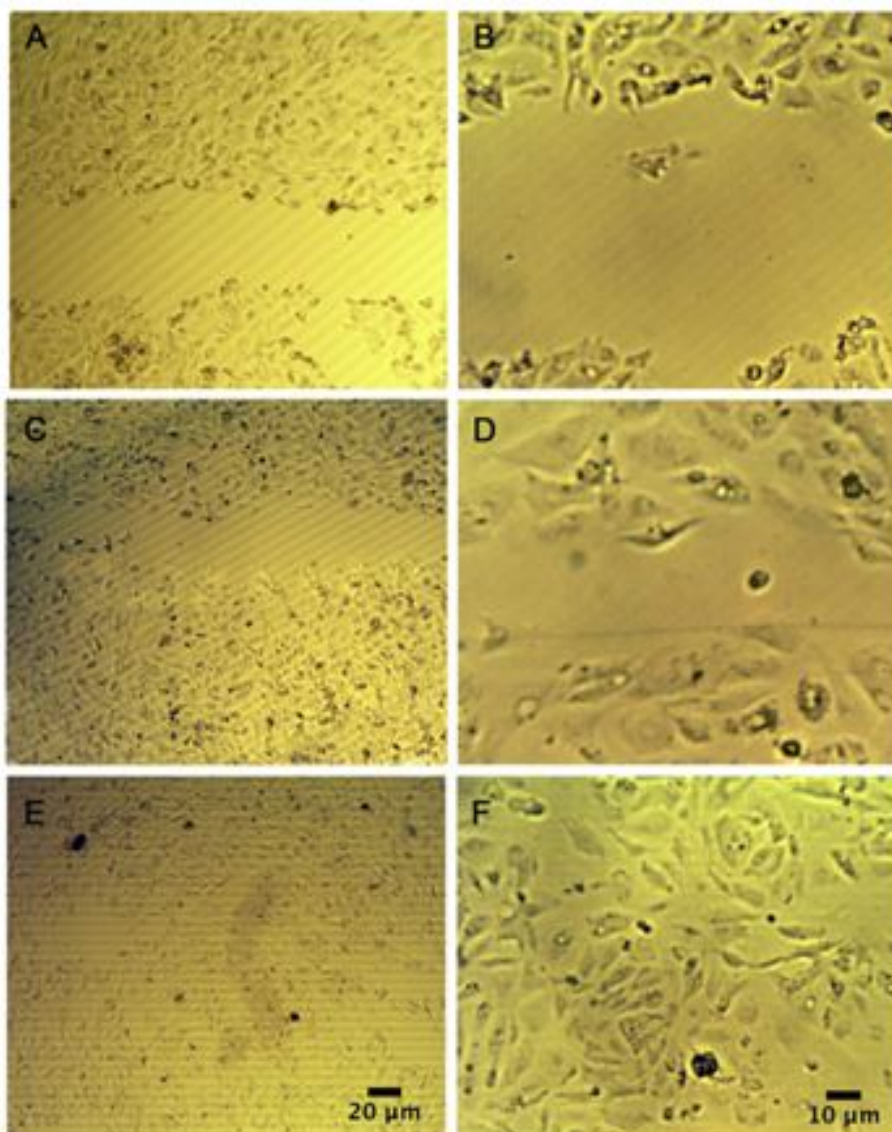




2. Capacidad de migración de las células tumorales en cultivo

Todas las monocapas tuvieron un potencial de migración, evaluado con la técnica del scratch-healing (Figura 3).

Figura 3

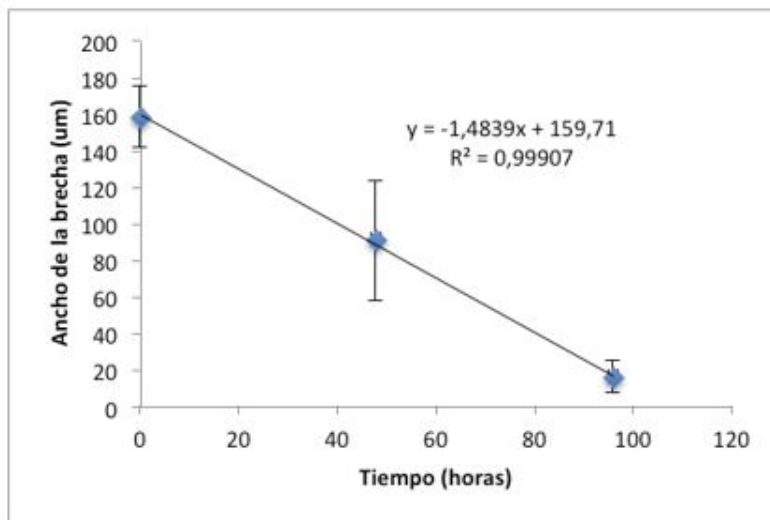


La apertura de la brecha se cuantificó con el software ImageJ cada 12 hs hasta sellado total, tomado medidas perpendiculares al eje central de la brecha en 10 campos representativos.



En la Figura 4 se grafican estas distancias promedio \pm SEM en función del tiempo para el cálculo de la velocidad del cierre de la brecha (1,4839 μ m / hora).

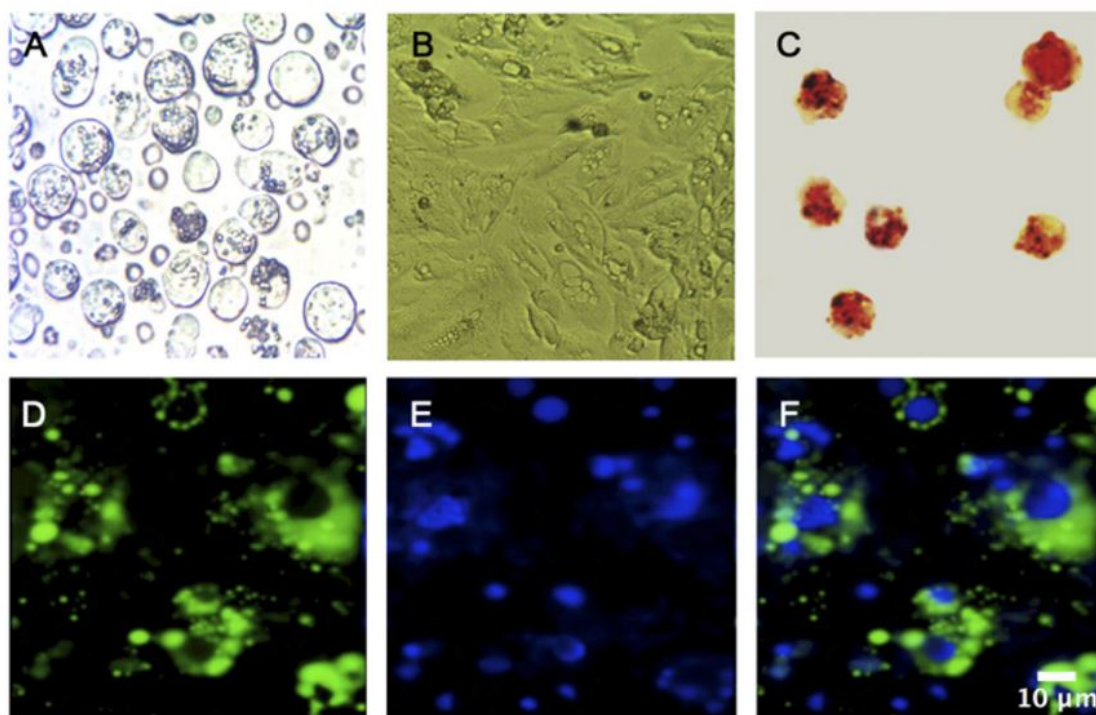
Figura 4



3. Evaluación del perfil lipídico:

Tras su aislamiento, las células de CRCC se mostraron con típica morfología redondeada repleta de gotas lipídicas (lipid droplets) que fueron visibles por simple refringencia (Figura 5 A y B) con microscopía óptica, como con la tinción de Red Oil (Figura 5C).

Figura 5





Luego de su adherencia en el cultivo, las células de CRCC adquirieron morfología poligonal conservando el fenotipo lipogénico con abundantes lipid droplets en su citoplasma, que fueron visualizadas tanto con la coloración de Red Oil como con la coloración fluorescente con BODIPY [15] (Figura 5 D-F).

Discusión

Existen numerosos estudios “in vitro” para evaluar la biología de los tumores sólidos con mayor o menor grado de similitud al status “in vivo”, entre ellos, cultivos de explantes tumorales, de riñones perfundidos, de cortes de tejido renal, segmentos de nefrones, líneas celulares inmortalizadas y cultivos primarios renales¹⁰. Si bien el uso de líneas inmortalizadas ha permitido dilucidar variados aspectos del metabolismo celular; es sabido que el mantenimiento de la fenotipia no es duradero y que a menudo no pueden extrapolarse los resultados a una situación operante in vivo^{8, 18}.

Este estudio permitió ajustar los cultivos primarios a nuestras condiciones experimentales a un rendimiento aceptable en cuanto a aislamiento, adherencia, subcultivos y cinética de crecimiento a partir de muestras de CCRC.

El estudio de la cinética de crecimiento y la optimización técnica de las condiciones de cultivo adaptadas a nuestras condiciones experimentales ofrece nuevas herramientas para disponer de células en cantidad suficiente para el desarrollo de diversos estudios posteriores (western blottings, inmunocitoquímica, IFI, RT-PCR y qPCR). Adicionalmente se comprobó la conservación del perfil lipogénico durante los sucesivos pasajes o subcultivos que conservaron similar cinética de crecimiento¹⁹.

Conclusión:

La implementación de cultivos primarios de células tumorales renales humanas de pacientes diagnosticados con CRCC; permite analizar in vitro, la variación cuantitativa y cualitativa del perfil metabólico, en particular del adipogénico y de la expresión de proteínas de interés relacionadas con la hipoxia del microambiente tumoral, la apoptosis y la angiogénesis para intentar establecer entre otras cosas: nuevos targets terapéuticos, posibles biomarcadores para CRCC y establecer un correlato con los indicadores de malignidad y progresión tumoral.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Jefe de Servicio de Patología del Hospital J. R. Vidal de la provincia de Corrientes, Dra. María I. Delfino y a los demás anatomopatólogos del mismo.

Este trabajo fue subsidiado por SGCyT UNNE PI-I008-2012 y el PICTO FONCyT UNNE 0212-2011.

Conflictos de Intereses

Los autores no declaran conflictos de intereses.



Bibliografía

- [1] Z.F. Bielecka, A.M. Czarnecka, W. Solarek, A. Kornakiewicz, C. Szczylik, Mechanisms of Acquired Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Clear - Cell Renal Cell Carcinoma (ccRCC), *Current signal transduction therapy*, 8 (2014) 218-228.
- [2] L. Bonanno, A. Jirillo, A. Favaretto, Mechanisms of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors and new therapeutic perspectives in non small cell lung cancer, *Current drug targets*, 12 (2011) 922-933.
- [3] N. Basic-Jukic, T. Hudolin, M. Radic-Antolic, M. Coric, R. Zadro, Z. Kastelan, J. Pasini, D. Bandic-Pavlovic, P. Kes, Bone morphogenetic protein-7 expression is down-regulated in human clear cell renal carcinoma, *Journal of nephrology*, 24 (2011) 91-97.
- [4] I. Cifola, C. Bianchi, E. Mangano, S. Bombelli, F. Frascati, E. Fasoli, S. Ferrero, V. Di Stefano, M.A. Zipeto, F. Magni, S. Signorini, C. Battaglia, R.A. Perego, Renal cell carcinoma primary cultures maintain genomic and phenotypic profile of parental tumor tissues, *BMC cancer*, 11 (2011) 244.
- [5] C.R. Santos, A. Schulze, Lipid metabolism in cancer, *The FEBS journal*, 279 (2012) 2610-2623.
- [6] M.P. Wymann, R. Schneiter, Lipid signalling in disease, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9 (2008) 162-176.
- [7] F. Zhang, G. Du, Dysregulated lipid metabolism in cancer, *World journal of biological chemistry*, 3 (2012) 167-174.
- [8] F.J. Kim, A. Campagna, L. Khandrika, S. Koul, S.S. Byun, A. vanBokhoven, E.E. Moore, H. Koul, Individualized medicine for renal cell carcinoma: establishment of primary cell line culture from surgical specimens, *Journal of endourology / Endourological Society*, 22 (2008) 2361-2366.
- [9] R.A. Perego, C. Bianchi, M. Corizzato, B. Eroini, B. Torsello, C. Valsecchi, A. Di Fonzo, N. Cordani, P. Favini, S. Ferrero, M. Pitto, C. Sarto, F. Magni, F. Rocco, P. Mocarelli, Primary cell cultures arising from normal kidney and renal cell carcinoma retain the proteomic profile of corresponding tissues, *Journal of proteome research*, 4 (2005) 1503-1510.
- [10] M.J. Valente, R. Henrique, V.L. Costa, C. Jeronimo, F. Carvalho, M.L. Bastos, P.G. de Pinho, M. Carvalho, A rapid and simple procedure for the establishment of human normal and cancer renal primary cell cultures from surgical specimens, *PloS one*, 6 (2011) e19337.
- [11] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of immunological methods*, 65 (1983) 55-63.
- [12] A. Cerezo, M.C. Guadamillas, J.G. Goetz, S. Sánchez-Perales, E. Klein, R.K. Assoian, M.A. del Pozo, The absence of caveolin-1 increases proliferation and anchorage- independent growth by a Rac-dependent, Erk-independent mechanism, *Mol. Cell. Biol*, 29 (2009) 5046-5059.
- [13] M.J. Deutsch, S.C. Schriever, A.A. Roscher, R. Ensenuer, Digital image analysis approach for lipid droplet size quantitation of Oil Red O-stained cultured cells, *Analytical biochemistry*, 445 (2014) 87-89.
- [14] T. Sakurai, S. Kurata, K. Ogino, Development of a novel optical sensing method for acid solution using Oil Red O supported by florisil, *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 31 (2015) 51-54.
- [15] C. Guijas, G. Perez-Chacon, A.M. Astudillo, J.M. Rubio, L. Gil-de-Gomez, M.A. Balboa, J. Balsinde, Simultaneous activation of p38 and JNK by arachidonic acid stimulates the cytosolic phospholipase A2-dependent synthesis of lipid droplets in human monocytes, *J Lipid Res*, 53 (2012) 2343-2354.
- [16] C.C. Liang, A.Y. Park, J.L. Guan, In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro, *Nature protocols*, 2 (2007) 329-333.
- [17] T.R. Stoyanoff, J.S. Todaro, M.V. Aguirre, M.C. Zimmermann, N.C. Brandan, Amelioration of lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by erythropoietin: involvement of mitochondria-regulated apoptosis, *Toxicology*, 318 (2014) 13-21.
- [18] J. Fogh, Cultivation, characterization, and identification of human tumor cells with emphasis on kidney, testis, and bladder tumors, *National Cancer Institute monograph*, (1978) 5-9.
- [19] C. Guijas, A.M. Astudillo, L. Gil-de-Gomez, J.M. Rubio, M.A. Balboa, J. Balsinde, Phospholipid sources for adrenergic acid mobilization in RAW 264.7 macrophages. Comparison with arachidonic acid, *Biochim Biophys Acta*, 1821 (2012) 1386-1393.



Datos de autor

Carátula

Optimización de cultivos primarios de células de carcinoma renal de células claras como modelo "in vitro" para estudios metabólicos y determinantes de progresión neoplásica

Optimization of primary culture cell conditions of clear cell renal carcinoma as an "in vitro" tool to be used for metabolic studies and neoplastic progression markers

Cultivos Primarios en CRCC - Primary cultures CRCC - As culturas primárias CRCC

Autores

Melana¹, Juan Pablo,
Rodríguez¹, J.P.,
Stoyanoff¹, T.R.,
Espada^{1,2}, J.D.,
J.S. Todaro¹,
Aguirre¹, M.V. *

1. Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas de la Facultad de Medicina (LIBIM): Cátedra de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad Nacional del Nordeste. Moreno 1240 (3400). Corrientes. Argentina.

2. Servicio de Urología del Hospital Juan R. Vidal. Corrientes.

*Contacto: mvaguirre@med.unne.edu.ar