



Actas Urológicas Españolas

www.elsevier.es/actasuro



ARTÍCULO ORIGINAL

¿Hay lugar para la cuantificación de la población de células uroteliales luminales basales?

G.R. Passos^a, J.A. Camargo^a, K.L. Ferrari^a, G.C. Franch Jr.^a, A.E. Nowill^a y L.O. Reis^{b,*}

^a School of Medical Sciences, University of Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil

^b Urologic Oncology Department, Pontifical Catholic University of Campinas PUC-Campinas, São Paulo, Brasil

Recibido el 23 de octubre de 2016; aceptado el 21 de noviembre de 2016

PALABRAS CLAVE

Luminal;
Basal;
Intermedio;
Pronóstico;
Urotelio

Resumen

Propósito: Tres capas celulares componen el urotelio: basal, intermedio y luminal («células en paraguas») y diferentes enfermedades pueden surgir de diferentes poblaciones celulares. El objetivo de este estudio es analizar la capacidad de cuantificación de dichas poblaciones celulares utilizando 4 protocolos diferentes.

Métodos: Se aleatorizaron 20 ratas macho (Wistar) en 4 grupos de 5 animales: raspado, enzimático 30, 45 y 60 minutos. Las células se aislaron, se analizaron mediante citómetro de flujo y se procesaron datos mediante el software BD FACSDIVA™.

Resultados: El urotelio se separó en 2 poblaciones celulares que son diferentes en tamaño y complejidad. El grupo que mostró más eficiencia en la disociación de células y la separación celular fue el protocolo enzimático de 45 minutos.

Conclusiones: El protocolo enzimático de 45 minutos fue capaz de aislar las poblaciones de células uroteliales, y podría ser explorado como herramienta pronóstica potencial, selección de pacientes y objetivo terapéutico en las enfermedades uroteliales. Estudios futuros deberían validar la aplicación clínica potencial al racional propuesto del paradigma luminal basal en el cáncer urotelial como esperanza para un abordaje individualizado.

© 2017 AEU. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: reisleo.l@gmail.com (L.O. Reis).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.acuro.2016.11.010>

0210-4806/© 2017 AEU. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Luminal;
Basal;
Intermediate;
Prognostic;
Urothelium

Is there room for luminal-basal urothelial cell population quantification?

Abstract

Purpose: Three cell layers compose the urothelium: basal, intermediate and luminal ('umbrella cells') and different diseases might arise from different cell populations. The aim of this study is to analyze the quantification ability of such cell populations by using four different protocols.

Methods: Twenty male rats (Wistar) were randomized in four groups of five animals: scraping, enzymatic 30, 45 and 60 minutes. The cells were isolated, analyzed by flow cytometer and data processed by BD FACSDIVA™ software.

Results: The urothelium was separated in two cell populations that are different in size and complexity. The group that showed more efficiency in cells dissociation and cells separation was enzymatic protocol 45 minutes.

Conclusions: Enzymatic protocol 45 minutes was able to isolate urothelial cell populations and might be explored as potential prognostic tool, patient selection and therapeutic target in urothelial diseases. Future studies should validate the potential clinical application to the proposed rational of luminal-basal paradigm in the urothelial cancer as hope for individualized approach.

© 2017 AEU. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

Estructuralmente la vejiga urinaria de mamíferos es una esfera hueca, compuesta de 3 capas: células basales unidas a una membrana basal (5-10 μm), células intermedias (20 μm) y células lumbales, una capa superficial compuesta de grandes células hexagonales, conocida como «células en paraguas» (25-250 μm)^{1,2}. Estas células presentan características únicas que les permiten formar una barrera entre la orina y los tejidos subyacentes, incluyendo uniones estrechas, lípidos específicos de membrana, placas de uroplaquina y glucosaminoglucanos³.

Debido a la artificialidad de las líneas celulares comercialmente disponibles, y los retos sobre la accesibilidad de los tejidos y el procesamiento celular, existe una brecha en cuanto al aislamiento de las poblaciones de células uroteliales de las biopsias en el estudio de la enfermedad urotelial⁴⁻⁶.

Para el aislamiento de células se han utilizado astillado de células epiteliales y enzimas proteolíticas. Se ha estudiado y combinado una variedad de técnicas y soluciones para mantener la viabilidad celular y la integridad para el análisis de citometría. Sin embargo, la literatura científica sufre de la falta de un procedimiento estándar fiable para este propósito⁷.

El objetivo de este estudio es analizar la disponibilidad y viabilidad de diferentes poblaciones de células uroteliales mediante 4 protocolos diferentes: el astillado del tejido y el uso de la digestión enzimática del tejido (mezcla de enzimas proteolíticas y colagenolíticas) a los 30, 45 y 60 minutos.

Materiales y métodos

Animales y procedimientos

Después de la aprobación del comité de ética, 20 ratas macho Wistar fueron asignadas al azar en 4 grupos: 5 en

el método 1 (raspado); 5 en el método 2 a (enzimático a los 30 min), 5 en el método 2 b (enzimático a los 45 min) y 5 en el método 2 c (enzimático a los 60 min). Cada rata se sacrificó con tiopental sódico (Cristália, Brasil) y luego la vejiga fue extirpada quirúrgicamente y se invirtió⁸.

Tratamiento mecánico y digestión del tejido vesical

Método 1

Las vejigas invertidas se rasparon con cuchilla de bisturí número 10, se lavaron con PBS y las células se resuspendieron en RPMI suplementado con FBS al 10% para análisis citométrico inmediato.

Método 2

Las vejigas invertidas se llenaron con solución salina fisiológica y se pusieron en solución Accutase™ (BD Biosciences, EE. UU.) bajo agitación a 37 °C en diferentes momentos: 30 minutos (2 a), 45 minutos (2 b) y 60 minutos (2 c). Después se retiraron y las células se lavaron con PBS y se volvieron a suspender en RPMI suplementado con FBS al 10% para análisis citométrico inmediato.

Análisis de citometría

Las células se separaron en 2 tubos, uno con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de yoduro de propidio y el otro solo con las células. Ambos fueron leídos y un total de 10.000 eventos fueron analizados en un citómetro de flujo FACSort (BD Biosciences, EE. UU.). BD FACSDIVA™ SOFTWARE procesó los datos.

Análisis histopatológico

Para la identificación de las capas celulares uroteliales (basales, intermedias y lumbales) se obtuvo la vejiga urinaria y se fijó en paraformaldehído al 4%, embebido en Paraplast (Paraplast Plus®, St. Louis, EE. UU.). Se cortó

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/8769203>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/8769203>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)