

# Método para amplificar cultivos primarios de células epiteliales bronquiales

G. Margarit, J. Belda, P. Casan y J. Sanchis

Departamento de Neumología. Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau. Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, España.

**OBJETIVO:** Los cultivos celulares son un buen modelo para el estudio de las enfermedades pulmonares, pero son difíciles de reproducir y producen un número limitado de células. El objetivo de este estudio ha sido desarrollar un método que incrementase la producción de células epiteliales bronquiales (CEB) humanas en cultivos primarios.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** Se procesó un total de 12 muestras (9 procedentes de muestras quirúrgicas y 3 de biopsias endoscópicas) en placas recubiertas de colágeno tipo I con medio suplementado para CEB. Al iniciarse la proliferación celular a su alrededor, los explantes se extrajeron y subcultivaron sucesivamente. Las células restantes se dejaron proliferar y se tripsinizaron tras alcanzar más del 50% de confluencia. Se valoraron el número de células obtenidas, la viabilidad y la citoqueratina 7.

**RESULTADOS:** El número total de células obtenidas con este método superó en una media de 3 veces el número de CEB humanas obtenidas en cultivos primarios simples. El número máximo de subcultivos fue de 5, la viabilidad media ( $\pm$  desviación estándar) fue de  $91,9 \pm 11,7\%$  y el porcentaje de células positivas para la citoqueratina 7 del  $30,71 \pm 10,68\%$ .

**CONCLUSIONES:** El método descrito para amplificar cultivos primarios de CEB permite incrementar la producción de células obtenidas.

**Palabras clave:** Cultivos primarios. Células epiteliales bronquiales. Amplificación. Explantes. Citoqueratina 7.

## Expansion of Primary Epithelial Cell Cultures

**OBJECTIVE:** Cell cultures provide a good model for studying lung diseases but they are difficult to reproduce and the number of cells obtained is limited. The aim of this study was to develop a way to increase the production of human bronchial epithelial cells (BEC) in primary cultures.

**MATERIAL AND METHODS:** A total of 12 samples (9 from surgical specimens and 3 from endoscopic biopsies) were processed on plates coated with type I collagen with growth medium supplemented for BEC. When cell proliferation started, the explants were removed for successive subculturing. The remaining cells were left to proliferate and were trypsinized after 50% confluence. We recorded the number of cells obtained, cell viability, and the percentage positive for cytokeratin 7.

**RESULTS:** The total number of cells obtained by this method was 3-fold the number of human BEC obtained with simple primary cultures. The maximum number of subcultures was 5, mean (SD) cell viability was 91.9% (11.7%), and the percentage of cells positive for cytokeratin 7 was 30.71% (10.68%).

**CONCLUSIONS:** The described method for expanding primary BEC cultures increases cell production.

**Key words:** Primary cultures. Bronchial epithelial cells. Culture expansion. Explants. Cytokeratin 7.

## Introducción

Estudios recientes demuestran que el epitelio bronquial es más que una simple barrera estructural, contribuye al inicio y a la persistencia del infiltrado inflamatorio, además de inducir cambios estructurales de la misma pared de la vía aérea<sup>1</sup>. Por lo tanto, el estudio del epitelio es interesante para conocer cómo comienzan o se mantienen diversas enfermedades respiratorias, además de otras funciones todavía sin determinar.

Los modelos *in vitro* basados en cultivos primarios de células epiteliales bronquiales (CEB) humanas son

difíciles de desarrollar. El cultivo primario se realiza a partir de explantes de muestras que proceden de pacientes operados, de material extraído de las autopsias o bien de fragmentos de biopsias obtenidas a través de un broncoscopio<sup>2</sup>. Los fragmentos de tejido obtenidos son pequeños y, por lo tanto, rinden un escaso número de CEB. Para solucionar la dificultad de obtener un número suficiente de células requeridas en experimentos más complejos, se han desarrollado líneas comerciales de CEB. Estas células no siempre proporcionan el genotipo de la enfermedad en estudio<sup>3</sup>.

El objetivo del presente estudio ha sido desarrollar un método que incrementase la producción de CEB humanas en cultivo primario. Este método permitiría realizar estudios complejos repetidos a partir de explantes de muestras de un mismo paciente procedentes de broncoscopia o cirugía torácica.

Este estudio ha sido subvencionado en parte por Red-Respira-ISCIH-RTIC-03/11.

Correspondencia: Dra. G. Margarit.  
Antoni M.<sup>3</sup> Claret, 167. 08025 Barcelona, España.  
Correo electrónico: gmargarit@hsp.santpau.es

Recibido: 14-1-2005; aceptado para su publicación: 1-2-2005.

## Material y métodos

### Obtención de muestras

Se incluyeron muestras de pacientes sometidos a resección quirúrgica o bien a broncoscopia según el manejo habitual de sus enfermedades siguiendo los protocolos estandarizados. Se informó acerca del tipo de intervención realizada a todos los pacientes, que firmaron su consentimiento. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del hospital.

### Cirugía torácica

Se incluyeron muestras de 9 pacientes que se sometieron a cirugía torácica resectiva por tumoración. De la pieza quirúrgica extirpada se seleccionó y seccionó un pequeño fragmento no afectado, situado en el extremo más distal de la zona patológica.

### Broncoscopia

Se incluyó a 3 pacientes a los que se practicó una broncoscopia. Con ayuda de una pinza para broncoscopio se realizó una biopsia por paciente en la carina principal considerando que esta zona no presentara aspecto patológico.

### Cultivos celulares

La composición del medio y las concentraciones finales se prepararon según Devalia et al<sup>2</sup>. El medio de cultivo 199 con L-glutamina se suplementó con 2,5 µg/ml de insulina, 0,361 µg/ml de hidrocortisona y 2,5 µg/ml de apo-transferrina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.), un 2,5% de Nu-serum IV y 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (Becton Dickinson, Bedford, MA, EE.UU.), un 1% de penicilina-estreptomina (Life Technologies, Gibco BRL, Grand Island, NY, EE.UU.) y 2 µg/ml de anfotericina B (Squibb Industria Farmacéutica S.A., Esplugues de Llobregat, Barcelona, España).

### Obtención de células epiteliales

De la pieza procedente de quirófano se obtuvo el máximo número de explantes raspando la cara interna del bronquio con ayuda de unas pinzas y un bisturí. Las biopsias endoscópicas se dividieron en fracciones o explantes. Todos los explantes midieron de 1 a 2 mm. Se lavaron con suero fisiológico, cloruro sódico al 0,9%, con un 1% de penicilina-estreptomina, y se colocaron en placas previamente tratadas con colágeno tipo I (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.) para estimular su proliferación. Se añadió una gota de medio 199 suplementado sobre cada explante después de asegurarse de su adhesión a la placa. La placa se incubó a 37 °C, con un 5% de dióxido de carbono y un 90% de humedad, y no se movió durante 3 días para evitar que se despegaran los explantes. Transcurrido este tiempo, se reemplazó el medio por 3 ml de medio nuevo por placa. En días alternos se siguió la proliferación celular bajo lupa y se cambió el medio de cultivo.

### Subcultivo de explantes

Los explantes se subcultivaron en otra placa, a los 10 días, cuando se observó un radio de proliferación celular moderado a su alrededor. Se retiraron los explantes de tejido y se transfirieron a otra placa recubierta de colágeno respetando el resto de CEB.

### Disgregación enzimática

Cuando las células recubrían más de la mitad de la superficie de crecimiento, a las 3 semanas, se disgregaron enzimáticamente. Se extrajo el medio de las placas y se lavaron con suero fisiológico estéril, con un 1% de penicilina-estreptomina.

Se añadieron 2 ml de la solución tripsina-EDTA (Biological Industries, Beit Haemek Kibbutz, Israel) por placa y se incubaron a 37 °C durante 5 min. Para inhibir la acción de la tripsina, se añadieron 2 ml de suero fetal bovino (Biological Industries, Beit Haemek Kibbutz, Israel) y se centrifugó a 345 g durante 5 min. Se prepararon extensiones en duplicado para realizar la técnica inmunocitoquímica. El resto se resuspendió en 2 ml de suero fisiológico estéril al 0,9% con un 1% de penicilina-estreptomina. El recuento celular y la viabilidad se valoraron en 10 µl de esta suspensión con la utilización del colorante de exclusión azul de tripano al 0,4% (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EE.UU.) y la cámara de Neubauer.

### Tinción inmunocitoquímica para citoqueratina 7

Se utilizaron el anticuerpo primario monoclonal de ratón anticitoqueratina 7 humana y el anticuerpo secundario de cabra antiinmuglobulina G de ratón marcado con peroxidasa. La reacción química se realizó con el sustrato 3,3'-diaminobenzidina para peroxidasa y se tiñó con hematoxilina de Harris para contrastar. El material para inmunocitoquímica se obtuvo de DAKO corporation (Carpinteria, CA, EE.UU.). Se calculó el porcentaje de células positivas para anticitoqueratina 7. Paralelamente, se realizó un bloque de parafina con epitelio bronquial sano y se tiñó por inmunohistoquímica para calcular el porcentaje de células epiteliales positivas para citoqueratina 7. El control negativo para citoqueratina 7 fueron cultivos con fibroblastos.

### Análisis estadístico

En el análisis estadístico se utilizó el paquete informático Statistical Package for the Social Sciences (SPSS®) versión 10.0 (1999). Se obtuvieron los valores medios para cada variable y su desviación estándar.

## Resultados

Se obtuvo un total de 12 muestras: 9 procedentes de cirugía torácica y 3 de broncoscopia. Del total de casos, había 11 varones y 1 mujer, y la edad media ( $\pm$  desviación estándar) era de  $65 \pm 12$  años. Todos los sujetos eran fumadores o ex fumadores, con un volumen espiratorio forzado en el primer segundo medio del  $70 \pm 13\%$  de su valor teórico, y 5 de ellos habían recibido quimioterapia. Los resultados, caso por caso, se describen en la tabla I.

La media de explantes fue de  $18,1 \pm 14,0$  procedentes de muestras obtenidas por resección quirúrgica y de  $6 \pm 1,2$  procedentes de biopsia bronquial por broncoscopia. Los explantes de las muestras cultivadas se subcultivaron una media de 3,4 veces (entre 2 y 5 subcultivos). Los fragmentos procedentes de resección quirúrgica dieron mejores resultados que los procedentes de broncoscopia. En la tabla II se describen las medias por cada subcultivo.

La media en millones de CEB obtenidas después del procedimiento fue de  $2,42 \pm 4,08$  ( $3,18 \pm 4,5$  en muestras de resección quirúrgica y  $0,15 \pm 2,2$  en muestras de biopsia bronquial). La media del porcentaje de amplificación del número de CEB obtenidas de los cultivos primarios fue del  $300 \pm 143\%$  (del 343% para los casos de biopsia bronquial y del 200% para los de resección quirúrgica). En el total de CEB se observó una viabilidad media del  $91,9 \pm 11,7\%$ : del  $92,1 \pm 10,3\%$  en los casos de resección quirúrgica y del  $90,47 \pm 18,9\%$  en los de biopsia bronquial.

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/9383716>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/9383716>

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