

Células Wilms8 | 300416**Informações gerais****Description**

A linha celular Wilms8 foi derivada de um tumor primário de Wilms de um doente pediátrico com uma mutação WT1 na linha germinal. Esta linha celular é caracterizada por uma mutação homocigótica sem sentido no gene WT1 (c.1168 C>T, p.R390X), levando a uma perda completa da função do WT1. O WT1 é crucial para o desenvolvimento normal dos rins e a sua inativação é uma característica comum em certos subtipos agressivos do tumor de Wilms, particularmente naqueles que exibem diferenciação mesenquimal. Assim, o Wilms8 constitui um modelo valioso para estudar os efeitos da perda de WT1 na tumorigênese, especialmente no contexto dos tumores de Wilms que surgem com uma componente estromal pronunciada.

Para além da mutação do WT1, as células Wilms8 apresentam uma mutação no gene CTNNB1 (p.S45A), que codifica a β -Catenina, um regulador-chave da via de sinalização Wnt. A mutação na serina 45 interrompe o processo normal de fosforilação que leva à degradação da β -Catenina, causando a sua estabilização e acumulação no núcleo. Isto resulta na ativação constitutiva da sinalização Wnt, que impulsiona a proliferação celular e contribui para as propriedades oncogénicas da linha celular Wilms8. A interação entre a perda de WT1 e a sinalização Wnt aberrante em Wilms8 torna-a um modelo crucial para a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes a estas vias na biologia do tumor de Wilms.

As células Wilms8 apresentam um fenótipo mesenquimal, caracterizado pela expressão de vimentina e pela ausência de marcadores epiteliais como a citoqueratina. Isto está de acordo com a diferenciação estromal observada no tumor original. As células demonstram uma capacidade limitada de sofrer uma maior diferenciação mesenquimal, como a formação de células semelhantes a músculos em condições específicas. As análises proteómicas do Wilms8 revelaram a ativação de múltiplos receptores tirosina-quinases (RTKs), incluindo o PDGFR β e o AXL, que estão envolvidos em processos-chave como a sobrevivência, a migração e a proliferação celulares. A ativação de vias de sinalização a jusante, particularmente as vias MAPK e PI3K/AKT, contribui ainda mais para as características agressivas das células Wilms8.

De um modo geral, a linha celular Wilms8 constitui uma ferramenta essencial para a investigação da base molecular do tumor de Wilms causado pela perda de WT1 e pela sinalização Wnt aberrante. As suas características genéticas e fenotípicas fazem dela uma plataforma robusta para o estudo da interação entre estas vias críticas e para a identificação de potenciais alvos terapêuticos em tumores de Wilms com um componente estromal.

Organism Humano**Tissue** Rim**Disease** Tumor de Wilms**Applications** Modelo de cultura celular in vitro. Estudos bioquímicos**Caraterísticas****Age** 8 meses**Gender** Masculino

Células Wilms8 | 300416**Ethnicity** Caucasiano**Morphology** Em forma de fuso**Cell type** Células de Wilms**Growth properties** Aderente**Dados regulamentares****Citation** Wilms8 (número de catálogo Cytion 300416)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_A5SJ**Dados biomoleculares****Mutational profile** Estado da mutação WT1: homozigótico c.1168C>T, p.390x, LOH: , Estado da mutação CTNNB1: heterozigótico TCT>GCT, p.S45A**Manuseamento****Culture Medium** Kit MSCGM (da Lonza)**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Retirar o meio antigo das células aderentes e lavá-las com PBS sem cálcio e magnésio. Nos frascos T25, utilizar 3-5 ml de PBS e, nos frascos T75, 5-10 ml. Em seguida, cobrir completamente as células com Accutase, utilizando 1-2 ml para os frascos T25 e 2,5 ml para os frascos T75. Deixar as células incubar à temperatura ambiente durante 8-10 minutos para as destacar. Após a incubação, misturar suavemente as células com 10 ml de meio para as ressuspender e, em seguida, centrifugar a 300xg durante 3 minutos. Deitar fora o sobrenadante, ressuspender as células em meio fresco e transferi-las para novos frascos que já contenham meio fresco.

Células Wilms8 | 300416

Freeze medium

Como meio de criopreservação, utilizamos um meio de crescimento completo (incluindo FBS) + 10% DMSO para uma viabilidade pós-descongelamento adequada, ou CM-1 (número de catálogo Cytion 800100), que inclui osmoprotectores otimizados e estabilizadores metabólicos para melhorar a recuperação e reduzir o stress induzido pela crio.

Thawing and Culturing Cells

1. Confirme que o frasco permanece profundamente congelado aquando da entrega, uma vez que as células são enviadas em gelo seco para manter as temperaturas ideais durante o transporte.
2. Após a receção, armazenar o frasco criogénico imediatamente a temperaturas inferiores a -150°C para garantir a preservação da integridade celular, ou avançar para o passo 3 se for necessária uma cultura imediata.
3. Para uma cultura imediata, descongelar rapidamente o frasco imergindo-o num banho de água a 37°C com água limpa e um agente antimicrobiano, agitando suavemente durante 40-60 segundos até ficar um pequeno aglomerado de gelo.
4. Efetuar todos os passos subsequentes em condições estéreis numa capela de fluxo, desinfetando o frasco criogénico com etanol a 70% antes de o abrir.
5. Abrir cuidadosamente o frasco desinfetado e transferir a suspensão de células para um tubo de centrifugação de 15 ml contendo 8 ml de meio de cultura à temperatura ambiente, misturando suavemente.
6. Centrifugar a mistura a $300 \times g$ durante 3 minutos para separar as células e eliminar cuidadosamente o sobrenadante que contém o meio de congelação residual.
7. Ressuspender suavemente o pellet de células em 10 ml de meio de cultura fresco. No caso de células aderentes, dividir a suspensão entre dois frascos de cultura T25; no caso de culturas em suspensão, transferir todo o meio para um frasco T25 para promover uma interação e um crescimento eficazes das células.
8. Cumprir os protocolos de subcultura estabelecidos para o crescimento e manutenção contínuos da linha celular, garantindo resultados experimentais fiáveis.

Incubation Atmosphere

37°C , 5% CO_2 , atmosfera humidificada.

Flask Coating

Nenhum

Células Wilms8 | 300416

Freezing Procedure

As linhas celulares criopreservadas são expedidas em gelo seco em embalagens validadas e isoladas com refrigerante suficiente para manter aproximadamente -78 °C durante o transporte. Aquando da receção, inspecionar imediatamente o recipiente e transferir sem demora os frascos para um local de armazenamento adequado.

Shipping Conditions

As linhas celulares criopreservadas são expedidas em gelo seco em embalagens validadas e isoladas com refrigerante suficiente para manter aproximadamente -78 °C durante o transporte. Aquando da receção, inspecionar imediatamente o recipiente e transferir sem demora os frascos para um local de armazenamento adequado.

Storage Conditions

Para conservação a longo prazo, colocar os frascos em azoto líquido em fase de vapor a uma temperatura entre -150 e -196 °C. O armazenamento a -80 °C é aceitável apenas como um curto passo intermédio antes da transferência para azoto líquido.

Controlo de qualidade / Perfil genético / HLA

Sterility

A contaminação por micoplasma é excluída utilizando ensaios baseados em PCR e métodos de deteção de micoplasma baseados em luminescência.

Para garantir que não há contaminação bacteriana, fúngica ou de leveduras, as culturas de células são sujeitas a inspeções visuais diárias.

Alelos HLA

A*: '02:01:01, '03:01:01

B*: '15:01:01, '37:01:01

C*: '04:01:01, '06:02:01

DRB1*: '08:01:01G, '11:01:01

DQA1*: '04:01:01, '05:05:01

DQB1*: '03:01:01, '04:02:01

DPB1*: '03:01:01, '06:01:01

E: '01:03:02