

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

A linhagem celular Wilms8 foi derivada de um tumor de Wilms primário em um paciente pediátrico com uma mutação germinativa no gene WT1. Essa linhagem celular é caracterizada por uma mutação nonsense homozigótica no gene WT1 (c.1168 C>T, p.R390X), levando à perda completa da função do WT1. O WT1 é crucial para o desenvolvimento normal do rim, e sua inativação é uma característica comum em certos subtipos agressivos do tumor de Wilms, particularmente aqueles que apresentam diferenciação mesenquimal. O Wilms8, portanto, fornece um modelo valioso para o estudo dos efeitos da perda do WT1 na tumorigênese, especialmente no contexto de tumores de Wilms que surgem com um componente estromal pronunciado.

Além da mutação no 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 sua estabilização e acúmulo no núcleo. Isso resulta na ativação constitutiva da via de sinalização Wnt, que impulsiona a proliferação celular e contribui para as propriedades oncogênicas da linhagem celular Wilms8. A interação entre a perda de WT1 e a sinalização Wnt aberrante na Wilms8 torna-a um modelo crucial para a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes a essas 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. Isso está em consonância com a diferenciação estromal observada no tumor original. As células demonstram uma capacidade limitada de sofrer diferenciação mesenquimal adicional, como a formação de células semelhantes a células musculares sob condições específicas. Análises proteômicas do Wilms8 revelaram a ativação de múltiplas quinases de tirosina receptoras (RTKs), incluindo PDGFR β e AXL, que estão envolvidas em processos-chave, como sobrevivência celular, migração e proliferação. 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 modo geral, a linhagem celular Wilms8 serve como uma ferramenta essencial para investigar a base molecular do tumor de Wilms impulsionado pela perda de WT1 e pela sinalização Wnt aberrante. Suas características genéticas e fenotípicas a tornam uma plataforma robusta para estudar a interação entre essas vias críticas e para identificar alvos terapêuticos potenciais em tumores de Wilms com componente estromal.

Organism

Humano

Tissue

Rim

Disease

Tumor de Wilms

Applications

Modelo de cultura celular in vitro. Estudos bioquímicos

Características**Age**

8 meses

Gender

Masculino

Células de Wilms8 | 300416**Ethnicity** caucasiano**Morphology** Em forma de fuso**Cell type** Células de Wilms**Growth properties** Aderente**Dados regulatórios****Citation** Wilms8 (número de catálogo da Cytion 300416)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_A5SJ**Dados biomoleculares****Mutational profile** Status da mutação no WT1: homozigoto c.1168C>T, p.390x, LOH: , Status da mutação no CTNNB1: heterozigoto TCT>GCT, p.S45A**Manuseio****Culture Medium** Kit MSCGM (da Lonza)**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Remova o meio antigo das células aderentes e lave-as com PBS sem cálcio nem magnésio. Para frascos T25, use 3 a 5 ml de PBS; para frascos T75, use 5 a 10 ml. Em seguida, cubra as células completamente com Accutase, utilizando 1 a 2 ml para frascos T25 e 2,5 ml para frascos T75. Deixe as células incubarem à temperatura ambiente por 8 a 10 minutos para que se desprendam. Após a incubação, misture delicadamente as células com 10 ml de meio para ressuspender, depois centrifugue a 300xg por 3 minutos. Descarte o sobrenadante, ressuspenda as células em meio fresco e transfira-as para novos frascos que já contenham meio fresco.

Células de Wilms8 | 300416

Freeze medium

Como meio de criopreservação, utilizamos meio de crescimento completo (incluindo FBS) + 10% de DMSO para garantir viabilidade adequada após o descongelamento, ou CM-1 (número de catálogo da Cytion 800100), que inclui osmoprotetores e estabilizadores metabólicos otimizados para melhorar a recuperação e reduzir o estresse induzido pela criopreservação.

Thawing and Culturing Cells

1. Verifique se o frasco permanece profundamente congelado no momento da entrega, pois as células são enviadas em gelo seco para manter as temperaturas ideais durante o transporte.
2. Após o recebimento, armazene o criovial imediatamente a temperaturas abaixo de -150 °C para garantir a preservação da integridade celular ou prossiga para a etapa 3, caso seja necessária a cultura imediata.
3. Para cultura imediata, descongele rapidamente o frasco imergindo-o em um banho-maria a 37 °C com água limpa e um agente antimicrobiano, agitando suavemente por 40 a 60 segundos até que reste apenas um pequeno pedaço de gelo.
4. Realize todas as etapas subsequentes em condições estéreis em uma cabine de fluxo, desinfetando o criovial com etanol a 70% antes de abri-lo.
5. Abra cuidadosamente o frasco desinfetado e transfira a suspensão celular para um tubo de centrífuga de 15 ml contendo 8 ml de meio de cultura à temperatura ambiente, misturando delicadamente.
6. Centrifugue a mistura a 300 x g por 3 minutos para separar as células e descarte cuidadosamente o sobrenadante contendo o meio de congelamento residual.
7. Ressuspender suavemente o sedimento celular em 10 ml de meio de cultura fresco. Para células aderentes, dividir a suspensão entre dois frascos de cultura T25; para culturas em suspensão, transferir todo o meio para um frasco T25 a fim de promover a interação e o crescimento celular eficazes.
8. Siga os protocolos de subcultura estabelecidos para o crescimento contínuo e a manutenção da linhagem celular, garantindo resultados experimentais confiáveis.

Incubation Atmosphere

37 °C, 5% de CO₂, atmosfera umidificada.

Shipping Conditions

As linhagens celulares criopreservadas são enviadas em gelo seco, em embalagens isoladas e validadas, com refrigerante suficiente para manter a temperatura em aproximadamente -78 °C durante todo o transporte. Ao receber a remessa, inspecione o recipiente imediatamente e transfira os frascos sem demora para o local de armazenamento adequado.

Células de Wilms8 | 300416

Storage Conditions

Para preservação a longo prazo, coloque os frascos em nitrogênio líquido em fase de vapor a uma temperatura entre aproximadamente -150 e -196 °C. O armazenamento a -80 °C é aceitável apenas como uma etapa intermediária de curta duração antes da transferência para o nitrogênio líquido.

Controle de Qualidade e Análise Molecular

Sterility

A contaminação por micoplasma é descartada por meio de ensaios baseados em PCR e de métodos de detecção de micoplasma baseados em luminescência.

Para garantir que não haja contaminação por bactérias, fungos ou leveduras, as culturas celulares são submetidas a inspeções visuais diárias.