Junta de Andalucía
Consejería de Salud y Familias
BIOBANCO DEL SISTEMA SANITARIO PÚBLICO DE ANDALUCÍA

INFORME FINAL

Laboratorio

CULTIVOS CELULARES

Línea celular

Código antiguo: 38120086

Código nSIBAI: INVN01512A118

Nombre: BBSSPA-H-hMSC-FT#3

Biorecurso

Línea de Células Madre Mesenquimales Humanas (hMSC) derivadas de tejido adiposo.

Muestra de origen

Tejido de origen: Fragmentos de tejido adiposo humano cedidos al Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía (Biobanco del SSPA).

Sexo: Masculino.

Lugar procedencia: Hospital Universitario Puerto Real (Cádiz).

Generación celular

Las células se obtienen a través de fragmentos de tejido adiposo procesados según los procedimientos establecidos en el Biobanco del SSPA. Una vez obtenida la línea celular, se caracteriza y se expande.

Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado está compuesto por: DMEM-Advanced suplementado con 10% de FBS, 5ml de GlutaMAX(100X), 3ml de Penicillin-Streptomycin (10000U/ml), 1ml de Amphotericin B y 100µl de plasmocín (ANT-MPT).

Caracterización microbiológica

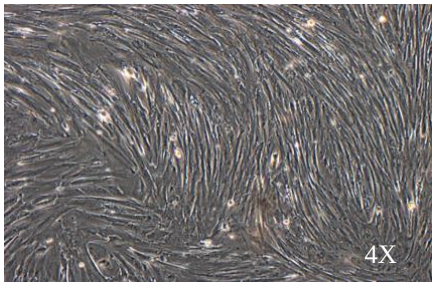
Comprobación de la ausencia de contaminación por Mycoplasma con 2 Kits:

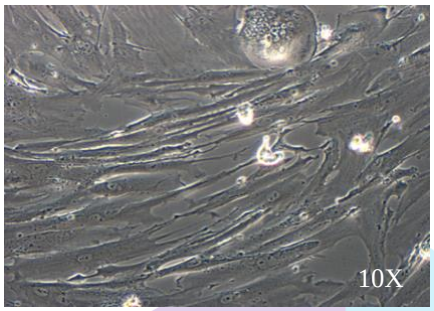
- Kit: Sigma LookOut Mycoplasma PCR Detection kit.
- Kit: Venor GeM (Minerva Biolabs). PCR (*Kit 16S rRNA Gene. Cat. Nº. MP-70114. Maxim Biocth, Inc*.)

Resultado: **Negativo**.

Caracterización Morfológica

La línea celular en cultivo muestra células con un gran ratio núcleo/citoplasma, que crecen adheridas en monocapa, con morfología fibroblastoide.



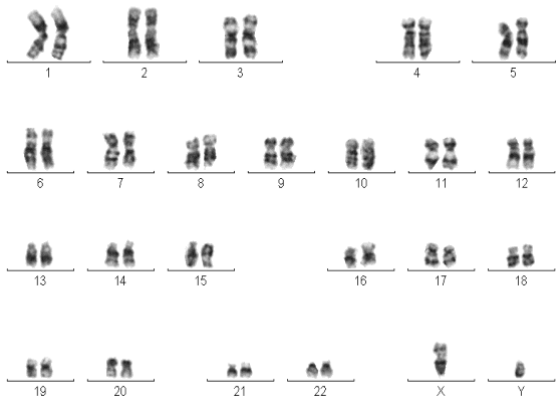


Caracterización Fenotípica Citometría

	Nº de pases	Resultados	Porcentaje
CD73	P7	+	100
CD90	P7	+	99.5
CD105	P7	+	99.7
CD14	P7	-	1.3
CD20	P7	-	1.3
CD34	P7	-	1.3
CD45	P7	-	1.3

Estabilidad Citogenética

La línea BBSSPA-H-hMSC-FT#3 tiene un cariotipo masculino correspondiente a 46, XY determinado mediante citogenética convencional por análisis de bandeo G.



Capacidad de Diferenciación:

Las células de la línea BBSSPA-H-hMSC-FT#3 se diferencian a condrocitos, osteocitos y adipocitos cuando se las cultiva con su correspondiente medio de diferenciación específico.

Huella Genética

El objetivo de esta técnica es detectar y poder confirmar que la línea celular derivada se corresponde genotípicamente con el tejido de origen del que procede.

Realizamos PCR múltiple para la identificación mediante la amplificación de 5 regiones de microsatélites diferentes. Se trata de STRs (trinucleótidos y tetranucleótidos) que varían en número de copias en función del individuo. Estos productos varían entre las 100-300 bp; concretamente se trata de 4 locis ligados al cromosoma X (GATA31E08, DXS6789, GATA175D03 y DXS7132) y un loci ligado al cromosoma Y (DYS390).

Resultado: **Coincidente**.

Conclusiones

La línea celular caracterizada presenta células con características definidas para ser identifcadas como Células Madre Mesenquimales humanas según el "*Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee*" de la *"International Society for Cellular Therapy* (ISCT)".

Formato de entrega

Biorecurso: Crioviales preservados en hielo seco o en cultivo.

Medio de preservación: CryoStor ® CS10/ FBS al 7% de DMSO.

Número de células congeladas: +1x10_6 células viables/vial.

Viabilidad >95%.

Recepción y descongelación

Las células son suministradas criopreservadas en hielo seco. Cuando las reciba, es recomendable antes de ser utilizadas su almacenamiento en contenedores de nitrógeno líquido en fase gas.

Procedimiento para la descongelación de la línea celular:

1. Preparar un tubo de centrífuga de 15 ml con 9 ml de medio de cultivo completo a temperatura ambiente. Mantener el tubo en la cabina de seguridad biológica.

2. Transferir el criovial a un baño térmico a 37ºC durante aproximadamente 2 minutos (hasta que se vea una pequeña bolita de hielo), evitando que el agua entre en contacto con el tapón.

3. Extraer el criovial del baño, esterilizar con etanol al 70% y añadir el contenido, gota a gota, al tubo previamente preparado.

4. Centrifugar a 1000-1200 rpm durante 3-5 min.

5. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet celular en medio de cultivo fresco atemperado.

6. Sembrar las células en frascos de cultivo de superficie adherente. Se recomienda sembrar las células de un criovial en un T75.

*La línea celular se ha cultivado en flask de cultivo adherentes de T75cm$_2$, T175cm$_2$ y T225cm$_2$

Siembra y Subcultivo

- Recomendamos sembrar a una densidad de 5.000-6.000 células/cm$_2$ para que la expansión sea óptima.

- El medio de cultivo debe ser reemplazado al siguiente día después de su siembra, y cada 3-4 días desde entonces.

- Las células han de ser subcultivadas cuando el cultivo haya alcanzado un 80-90 % de confluencia de la superficie de crecimiento.

Preservación celular

Las células obtenidas se congelan en crioviales con medio de preservación "CryoStor ® CS10" o FBS al 7% de DMSO en recipientes de congelación y se almacenan a -80ºC. Tras
24-48 horas, los crioviales se trasladan a contenedores de nitrógeno en fase gaseosa a -196ºC.

PRECAUCIONES

El uso de esta línea debe ser únicamente para investigación.

Normas de bioseguridad al utilizar esta línea celular

El usuario de esta línea celular ha de trabajar con nivel de bioseguridad tipo 2. Este nivel incluye el seguimiento de los siguientes puntos:

- Utilización de guantes protectores.

- Los materiales contaminados se desecharán en recipientes especiales para residuos.

- Los procedimientos de descontaminación incluirán lavarse las manos con jabón antibacteriano y lavar todas las superficies expuestas del laboratorio con los desinfectantes apropiados.

- El personal de laboratorio debe tener entrenamiento específico en el manejo de agentes patógenos.

- El acceso al laboratorio debe ser restringido cuando se esté realizando algún trabajo.

- Se tomarán precauciones extremas con instrumentos punzocortantes contaminados.

- Para su manipulación se utilizarán cabinas de trabajo de bioseguridad nivel 2.

- Además del resto de recomendaciones recogidas en la guía de "Buenas Prácticas de Laboratorio".