



Junta de Andalucía

Consejería de Salud y Familias

BIOBANCO DEL SISTEMA SANITARIO PÚBLICO
DE ANDALUCÍA

INFORME FINAL

Laboratorio

CULTIVOS CELULARES

Línea celular

Código antiguo: 32120212

Código nSIBAI: INVN02512A092

Nombre: BBSSPA-H-hMSC-UC#11

Biorecurso

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

Muestra de origen

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

Sexo: Femenino.

Lugar procedencia: Banco de Cordón Umbilical (Málaga).

Generación celular

Las células se obtienen a través de fragmentos de tejido de cordón umbilical 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 un Suero Fetal Bovino al 10%, 2mM de L-Glutamina, 89 Unidades/ml de la mezcla penicilina-streptomina, 0.45 µg/ml de anfotericina B y 100 µl de plasmocin.

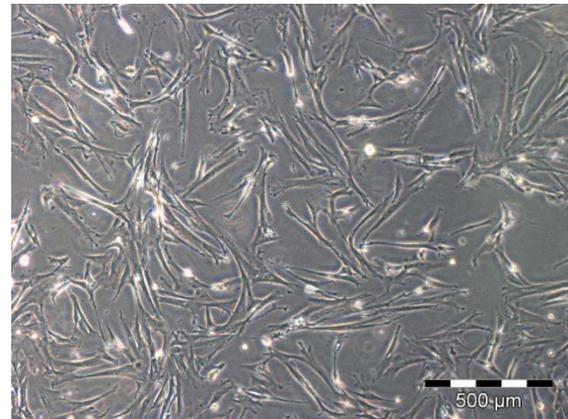
Caracterización microbiológica

Comprobación de la ausencia de contaminación por Mycoplasma con el Kit Sigma LookOut Mycoplasma PCR Detection kit.

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	+	98.5
CD90	P7	+	90.7
CD105	P7	+	91.8
CD14	P7	-	15.0
CD20	P7	-	15.0
CD34	P7	-	15.0
CD45	P7	-	15.0



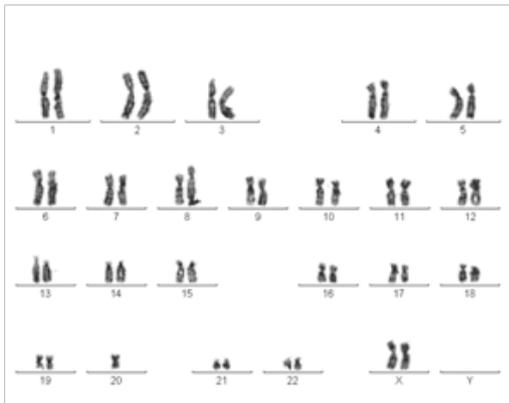
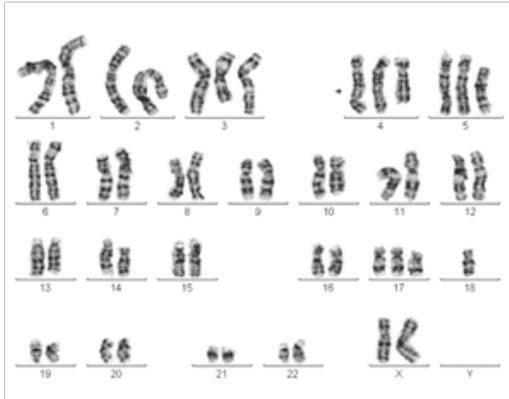
Junta de Andalucía

Consejería de Salud y Familias

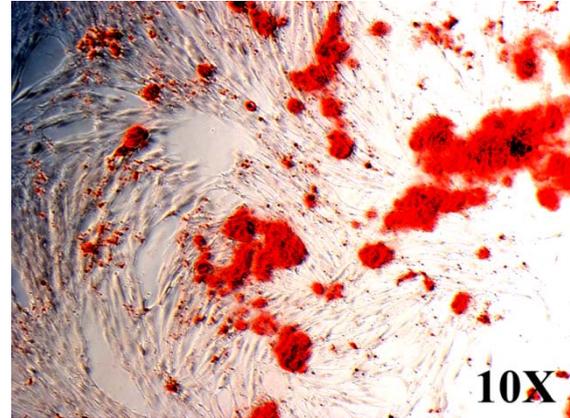
BIOBANCO DEL SISTEMA SANITARIO PÚBLICO
DE ANDALUCÍA

Estabilidad Citogenética

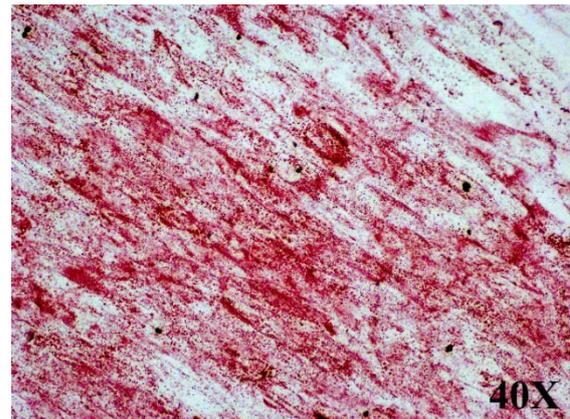
La línea BBSSPA-H-hMSC-UC#11 tiene un cariotipo femenino correspondiente a 46, XX determinado mediante citogenética convencional por análisis de bandejo G.



Diferenciación osteogénica revelada con tinción *Alizarin Red*:

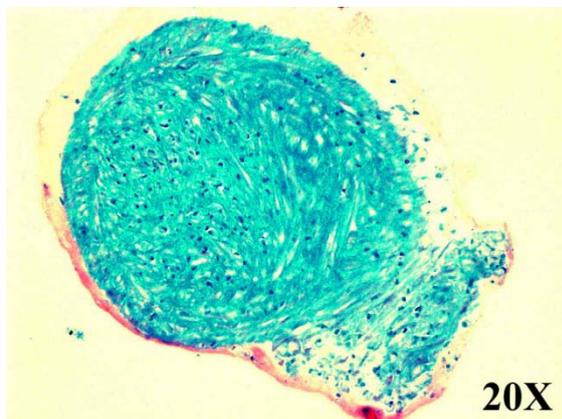


Diferenciación adipogénica revelada con la tinción *Oil Red-O*:



Capacidad de Diferenciación

Diferenciación condrogénica revelada con la tinción *Alcian Blue*:



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.**

BioBANCO del Sistema Sanitario Público de Andalucía

Parque Tecnológico Ciencias de la Salud. Centro de Investigación Biomédica

Avda. del Conocimiento s/n, 18016, Granada, España. Tel.: 958 894 672, biobanco.sspa@juntadeandalucia.es



Junta de Andalucía

Consejería de Salud y Familias

BIOBANCO DEL SISTEMA SANITARIO PÚBLICO
DE ANDALUCÍA

Conclusiones

La línea celular caracterizada presenta células con características definidas para ser identificadas 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

Número de células congeladas: $>1 \times 10^6$ 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 centrifuga 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 37°C 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 $T75\text{cm}^2$, $T175\text{cm}^2$ y $T225\text{cm}^2$

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 -80°C . Tras 24-48 horas, los crioviales se trasladan a contenedores de nitrógeno en fase gaseosa a -196°C .

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:



Junta de Andalucía

Consejería de Salud y Familias

BIOBANCO DEL SISTEMA SANITARIO PÚBLICO
DE ANDALUCÍA

- 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”.