



Curso práctico de Cultivo Celular II: Extracción y Cultivo de Células Madre

Cuaderno de laboratorio

NOMBRE

Índice

Guía de fabricación de células mesenquimales

1. Listado de Reactivos, materiales y equipos	3
2. Preparación de medios, reactivos y registro	5
3. Obtención y tratamiento con colagenasa I	7
4. Inicio de cultivo	8
5. Cambio de medio y tripsinización	13
6. Expansión	15
7. Congelación	
8. Administración	17

Guía de fabricación de células mononucleares

1. Descripción del proceso	39
2. Listado de reactivos, materiales y equipos	39
3. Preparación de medios, reactivos y registro	43
4. Tratamiento con Ficoll	47
5. Inicio de cultivo	51

Guía de fabricación de PRP Plasma Rico en Plaquetas

1. Resumen del proceso	55
2. Comprobaciones de estados de equipos	55
3. Extraer PRP (Plasma Rico en Plaquetas)	37

1. Guía de fabricación de células mesenquimales de lipoaspirado

Listado de reactivos, materiales y equipos

Listado de reactivos	
Nombre	Nombre
Tripsina	Dimetil sulfóxido (DMSO)
Suero bovino fetal FBS	Azul tripán
Solución Penicilina/estreptomicina 100 X	DMEM con glutamina
Suero salino fisiológico	Albúmina humana 20%
Tampón fosfato salino PBS	Colagenasa tipo I

Listado de materiales	
Nombre	Nombre
Tubos cónicos	Criotubos
Pipetas serológicas	Tubo tipo eppendorf 1,5ml
Puntas con filtro	Pipetas pasteur
Jeringas	Agujas
Filtro 0,22µm	Filtro nylon de 40µm
Frascos cultivo celular	

Notas:

Listado de equipos	
Nombre	Nombre
Cabina Flujo Laminar	Pipettus
Incubador de CO ₂	Pipetas
Microscopio	Centrifuga con freno
Congelador -80°C	Criogenizador
Balanza	

Comprobaciones de estados de equipos

Cada día antes de empezar los procesos de cultivo celular, comprobar el despeje de línea y el estado de limpieza de los equipos. Poner el ultravioleta en cabinas al menos 15 minutos antes de comenzar actividad.

Notas:

2. Preparación de medios, reactivos y registro

Los medios de cultivo que hay que preparar son:

Preparación de medios y alícuotas de reactivos		
Descripción	Nombre	Preparación de alícuotas
Medio de cultivo	DMEM con glutamina + 10 % suero bovino fetal (FBS) + 1 % Penicilina-Estreptomicina	El FBS se recibe congelado en botellas de 500ml o 1.000ml. Se descongela, y se hacen alícuotas de 45 ml en tubos de 50 ml. La solución 100 X penicilina/estreptomicina se recibe congelada en botellas de 100 ml. Se descongela y se hacen alícuotas de 5 ml en tubos de 15 mls.
Solución colagenasa I	Concentración 0,45% (1g en 220ml)	Realizadas alícuotas de 8 mls de la solución en tubos de 15 mls almacenadas a -20°C.
Medio de congelación	90% FBS y 10% dimetilsulfóxido (DMSO)	Realizar en el momento (900 µl de FBS + 100 µl de DMSO)
Medio de infusión	Suero salino fisiológico con 2% de albúmina humana	Realizar en el momento (50ml de suero fisiológico + 5ml de albúmina humana al 20%)

Notas:

Preparación de la colagenasa I

Descripción: La colagenasa se recibe liofilizada en gramos.

Procedimiento:

Realizar la solución con 10 ml de PBS al vial que contiene 1g ó 50 mg de colagenasa tipo I.

Pipetear hasta disolución del polvo de colagenasa.

- Si la colagenasa contiene 1 g, se diluirá hasta un volumen total de 500ml de PBS.
- Si la colagenasa contiene 50 mg, se diluirá hasta un volumen total de 25 ml de PBS

Filtrar a través de un filtro de baja retención proteica 0,22µm.

Realizar alícuotas de 5 ó 10 ml de la solución en tubos cónicos de 15ml y almacenar a -20°C.

Recoger al menos 2ml del final del alicuotado en un tubo cónico de 15ml para test de esterilidad de control de calidad.

La caducidad de la solución será la del reactivo de caducidad más corta.

Notas:

Registro de preparación de medios de cultivo			
Nombre del medio	Cantidad a preparar	Reactivos y cantidades utilizados	Fecha de preparación
DMEM Completo			

Notas:

3. Obtención de células MSC de lipoaspirado y tratamiento con colagenasa I

1. Homogeneizar la muestra agitándola con energía varias veces. Trasvasar no más de 30ml de lipoaspirado a tubos cónicos de 50ml. Rotular el tubo cónico

Cantidad de lipoaspirado _____

2. Añadir PBS hasta un volumen final de 40ml por tubo.

3. Centrifugar a 350g durante 5 minutos, a temperatura ambiente.

4. Desechar la fracción soluble (inferior) y el pellet granate aspirando con pipeta, con mucho cuidado de no perder fracción grasa, introduciendo la pipeta hasta el fondo y aspirado con el pipetus.

5. Repetir los pasos 2 y 3 dos veces más, para eliminar el máximo número de hematíes, esto sucede cuando es un lipoaspirado.

Si la muestra es extraída limpiamente la cantidad de hematíes es mínima.

Notas:

6. Añadir a cada tubo: 5 ml de colagenasa previamente activada (se activa mediante incubación a 37°C durante 1 hora).

5 ml serán para un volumen de 20 ml de lipoaspirado, realizar los cálculos para volumen diferente.

Se debe aumentar la cantidad de colagenasa hasta 7 ml si la cantidad de lipoaspirado se acerca a los 30 ml.

Cantidad de colagenasa _____

7. Añadir PBS hasta alcanzar un volumen total de 40 ml. Mezclar bien por inversión e incubar a 37°C con agitación suave durante un mínimo de 1 hora

Calcular la cantidad de PBS si varía la cantidad de colagenasa.

Tiempo de incubación _____

8. Inactivar añadiendo 3 ml de FBS y mezclar bien invirtiendo la muestra varias veces. Centrifugar a 350g durante 5 minutos a temperatura ambiente.

9. Retirar las fases superior (grasa y aceite), media (grasa más sólida), interfase (fibrosa), inferior (acuosa) y dejar el precipitado del fondo (células).

10. Lavar el precipitado con 40 ml de PBS.

Notas:

11. Centrifugar a 350g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Resuspender en 5 ml de medio de cultivo.

12. Filtrar las células por filtro de nylon de 40 μm sobre un nuevo tubo de 50ml. Realizar un lavado de los filtros utilizados con 10ml de PBS.

13. Centrifugar a 350g durante 5 minutos, a temperatura ambiente.

14. Si hubiera más de un tubo, unificar los sobrenadantes. Retirar en cabina el sobrenadante en envase estéril para muestra de control de calidad (esterilidad y micoplasma).

15. Resuspender cada pellet, dependiendo de su tamaño, en el volumen adecuado de medio de cultivo. Juntar toda la suspensión celular resultante en un solo tubo.

16. Se recoge alícuota de 100 μL de la muestra para hacer un conteo en cámara de Neubauer La mayoría son eritrocitos que no se pegarán y se eliminarán en el lavado del día siguiente.

Valor obtenido: _____

Notas:

4. Inicio de cultivo

Comenzar un cultivo de células madre mesenquimales (MSCs) a partir de las células recién aisladas de la muestra de lipoaspirado.

- Para calcular el número de frascos o factorías necesarios para iniciar los cultivos, las células MSC se resuspenden en medio de cultivo a una concentración de 500.000 a 1.000.000 células por cm^2
- Incubar 90 – 95 % de humedad, 5 % CO_2 y 37° C.

Notas:

5. Cambio de medio y tripsinización

Cambio de medio

A las 24-72 horas del inicio del cultivo, lavar con PBS abundante y retirar el sobrenadante, cambiar por medio de cultivo fresco.

- Evaluar periódicamente el aspecto del cultivo por el grado de confluencia. Si la confluencia de capa es aproximadamente un 80% pasar a tripsinización.
- Si las células están muy separadas, tripsinizar y resembrar a una concentración mayor.
- Si la confluencia es la adecuada, cambiar por medio de cultivo fresco (nunca más de dos veces por semana).

Tripsinización

1. Retirar en cabina parte del sobrenadante en un envase estéril para muestra de *control de calidad (esterilidad y micoplasma)* en la primera tripsinización.

Notas:

3. Realizar los siguientes pasos en cada tripsinización

- Lavar con PBS
- Añadir la cantidad de tripsina necesaria para disgregar los cultivos, que ha sido previamente atemperada. La cantidad de tripsina depende del tipo de frasco en el que se realiza el cultivo.

10ml para frascos T-175.

7ml para frascos T-75.

4ml para frascos T-25.

- Incubar de 3 a 10 minutos en incubador. Se observa en el microscopio si las MSCs se separan del fondo del frasco o factoría.
- Añadir al menos el doble de medio de cultivo completo cuando se compruebe que están levantadas
- Traspasar la suspensión celular a un tubo cónico.
- Centrifugar a 350 G durante 5-10 minutos, a temperatura ambiente.
- Retirar el sobrenadante, y resuspender el botón celular en medio de cultivo.
- Tomar una alícuota para contaje celular y diluir con PBS si es necesario.
- Calcular la concentración de células MSC mediante un contaje en cámara de Neubauer.

Notas:

6. Expansión

Aumento de la cantidad de células mesenquimales mediante crecimiento in vitro.

1. Realizar los siguientes pasos en cada pase:

- Calcular el número de frascos necesarios para expandir los cultivos. Las células MSC se resuspenden en medio de cultivo para obtener una concentración de 3.000 – 5.000 cel/cm². Se distribuyen en frascos según:
 - 1 T25 por cada 75.000 – 125.000 células, y entre 5 – 7ml de medio de cultivo.
 - 1 T75 por cada 225.000 – 375.000 células, y entre 10 – 20ml de medio de cultivo.
 - 1 T175 por cada 525.000 – 875.000 células, y entre 15 – 30ml de medio de cultivo.
 - 1 CF5 por cada 9.5×10^6 – 16×10^6 células, y entre 500-750 ml de medio de cultivo

- Los frascos se incuban en condiciones de 90 – 95 % de humedad, 5% CO₂ y 37 °C. Se registrará el número de pase para cada ciclo de expansión.
Cada tripsinización seguida de siembra supone un pase adicional al anterior. La primera tripsinización será siempre el pase # P1.

- Rotular: Fecha – N° de pase – Nombre del cultivo- Iniciales del responsable

Notas:

- Evaluar periódicamente el cultivo, lavar y retirar el sobrenadante cambiándolo por medio de cultivo fresco cuando sea conveniente.
- Evaluar el aspecto del cultivo evaluando el grado de confluencia.
- Cuando se considere necesario, pasar a tripsinización según lo ya explicado.

REGISTRO DE MANTENIMIENTO DE CULTIVO							
Nº Frasco	Nº Pase	% Capa	Tripsinización o Cambio de medio	% Capa	Firma/ Fecha	% Capa	Firma/ Fecha

2. Se continúa el proceso de expansión hasta que se obtenga el número de células solicitado de antemano para cada paciente. Se puede realizar una congelación de las células.

Notas:

7. Congelación

Procedimiento opcional en caso de exceso de células o necesidad de almacenamiento.

Procedimiento

- *Recoger sobrenadante para test de esterilidad y micoplasma*
- Resuspender el pellet total de células en 900µl de suero por vial y 100µl de DMSO.
- Una vez resuspendidas las células poner 1ml de la mezcla por vial.

REGISTRO DE CONGELACIÓN				
Nombre	Pase	Esterilidad/ Micoplasma	Cantidad de células	Fecha/ Firma

- Rápidamente meter los viales en un cryocooler y llevar a -80° C.

Después de un mínimo de 6 horas, pasar a nitrógeno líquido.

Notas:

8, Administración

Si se preparan células mesenquimales para administrar a un paciente:

- *Recoger sobrenadante para test de esterilidad y micoplasma*
- *Recoger células para realizar estudios de fenotipo por citometría de flujo.*

Producto terminado

1. Resuspender las células a infundir en medio de infusión (50 ml de suero fisiológico + 5 ml de albúmina humana al 20%)

Fecha	Nº células a administrar	Pase	Cantidad medio de infusión	Recoger sobrenadante esterilidad y micoplasma	Firma

Notas:

Notas:

Notas:

Notas:

Notas:

Guía de fabricación de células mononucleares

1. Resumen del proceso

Célula **mononuclear** de sangre periférica. Una célula **mononuclear** de sangre periférica (PBMC) es una célula sanguínea caracterizada por poseer un único núcleo redondo, como los linfocitos o los monocitos. Estas **células** sanguíneas son un componente crítico en el sistema inmune, concretamente para combatir las infecciones.

2. Listado de reactivos, materiales y equipos

Listado de reactivos	
Nombre	Nombre
Tampón fosfato salino PBS	Ficoll-Hypaque Plus
Dimetil sulfóxido (DMSO)	Azul tripán
Suero Humano AB o FBS	RPMI

Notas:

Listado de materiales	
Nombre	Nombre
Tubos cónicos	Puntas con filtro
Criotubos	Agujas
Pipetas serológicas	Pipetas Pasteur
Tubo tipo Eppendorf 1,5ml	Aguja 18G

Listado de equipos
Nombre
Cabina Flujo Laminar
Centrifuga
Microscopio
Pipettus
Pipetas

Comprobaciones de estados de equipos

Cada día de producción durante los procesos de cultivo celular, comprobar el despeje de línea y el estado de limpieza de los equipos. Poner el ultravioleta en cabinas al menos 15 minutos antes de comenzar la actividad.

Notas:

3. Preparación de medios y registro

Los medios de cultivo que hay que preparar son:

PREPARACION DE MEDIOS		
Descripción	Nombre	Preparación alicuotas
Medio de cultivo	RPMI + 10% FBS	
Medio de congelación	90% Suero AB o FBS y 10% dimetilsulfóxido (DMSO)	Realizar en el momento (900 μ l Suero AB o FBS + 100 μ l de DMSO)

Notas:

Registro de reactivos y materiales utilizados

Registrar los reactivos y materiales utilizados indicando la fecha de apertura en el caso de reactivos.

Registro de preparación de medios de cultivo			
Nombre del medio	Cantidad a preparar	Reactivos y cantidades utilizados	Fecha de preparación
RPMI Completo			

Notas:

4. Tratamiento con Ficoll

La obtención de células MN se realizará mediante separación por gradiente de densidades.

- En un tubo cónico de 15ml añadir 5ml de Ficoll. Se necesitará un tubo cónico de 15 ml por cada 5 ml de muestra recibida o diluida. Rotular el tubo

Anotar si la muestra inicial es sangre de cordón umbilical o Buffy Coat:

Si la muestra es cordón no se diluirá.

Si la muestra es Buffy Coat, la muestra se diluirá 1:1 con PBS.

- Se añaden 10ml a cada tubo tubo cónico ya preparado con 5ml de Ficoll o la cantidad de sangre que corresponda.

Si el tubo es de 50 ml calcular el Ficoll necesario.

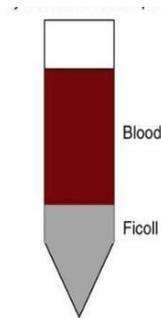
Se añade la muestra muy despacio, haciéndola resbalar por la pared del tubo con una inclinación de 45º aproximados.

Tener mucho cuidado para no mezclar la sangre con el Ficoll.

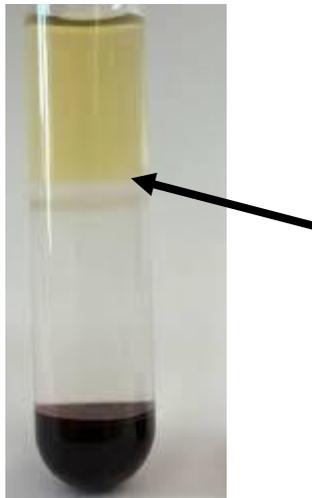
- Centrifugar a 350g durante 20 minutos, a temperatura entre 22°C y 25°C.

Importante: la centrífuga la dejamos sin freno.

Notas:



- Una vez que se termina la centrifugación, retirar el tubo y comprobar visualmente que se ha producido la separación de fases. Si no se ha producido, volver a repetir el paso anterior.
- En cabina, abrir el tubo y recuperar la interfase que contiene las células MN (es de color blanquecino y se encuentra sobre el Ficoll). Se recogen las células MN en un tubo nuevo (se utiliza un tubo nuevo por cada tubo usado anteriormente).



Notas:

5. Inicio de cultivo

1. Para lavar, añadir a las células mononucleares PBS en abundancia. Centrifugar a 350 g, durante 5-10 minutos. Temperatura entre 22°C y 25°C, con freno.
2. Retirar el sobrenadante y unificar todos los sedimentos celulares en un tubo.
3. *Retirar en cabina el sobrenadante en envase estéril para muestra de control de calidad (esterilidad y micoplasma).*
4. Resuspender en medio de cultivo el botón celular y tomar una alícuota para contaje celular. Calcular la concentración de células MN mediante contaje en cámara de Neubauer con ayuda de azul tripan para la viabilidad.

Valor obtenido Contaje: _____

5. Resuspender y mantener en cultivo a una concentración de 10^6 células/ml.
6. Homogeneizar el cultivo cada 3-4 días y recoger una alícuota para contaje.
7. Mantener el cultivo a una concentración de 10^6 células/ml.

Notas:

Notas:

Notas:

Guía de fabricación de PRP

Plasma Rico en Plaquetas

1. Resumen del proceso

El **Plasma Rico en Plaquetas (PRP)** es un material biológico obtenido de la misma sangre del paciente, tomando una muestra por una punción venosa, que posteriormente se centrifuga para separar los distintos componentes (glóbulos blancos, rojos, **plaquetas, plasma**).

Para denominarse rico en plaquetas, aumentaremos la cantidad de plaquetas que contiene biológicamente el plasma

2. Comprobaciones de estados de equipos

Cada día de producción durante los procesos de cultivo celular, comprobar el despeje de línea y el estado de limpieza de los equipos. Poner el ultravioleta en cabinas al menos 15 minutos antes de comenzar la actividad.

Notas:

3. Extraer PRP (Plasma Rico en Plaquetas)

Nº de tubos de sangre para extracción del
PRP _____

Centrifugar a 450g (2500 rpm), 10 min y temperatura ambiente

Retirar el plasma (parte superior) con cuidado de no transferir hematíes.

Volumen _____

Hemolizado SI NO

Cantidad de plasma _____ -

Rotular como plasma

Centrifugar a 450 g, 10 min y temperatura ambiente.

El pellet serán las plaquetas, por ello retirar la mitad del plasma de la parte superior y quedarnos con las plaquetas y la mitad del plasma

Resuspender la plaquetas en el plasma para obtener PRP

Cantidad de PRP_____

Rotular como PRP

Notas

Notas