

**Células Hep-56.1B | 400202****Informações gerais****Description**

A linha celular de hepatoma Hep-70.4 é derivada de um tumor hepático de rato, especificamente da estirpe de rato C57BL/6J. Esta linha celular destaca-se pelas suas mutações no gene p53, que foram identificadas em diferentes passagens durante a propagação in vitro. Na passagem número 8, foi detectado um sinal adicional fraco na análise de polimorfismo de conformação de cadeia simples (SSCP), indicando a presença de uma mutação p53. Na passagem número 38, foram identificadas duas mutações pontuais distintas no p53: uma transverso G:C para C:G no códon 135 e uma transverso C:G para G:C no códon 138 do exon 5. Estas mutações conduziram a alterações de aminoácidos de alanina para prolina e de cisteína para triptofano, respetivamente.

A linha celular Hep-70.4 apresenta um fenótipo morfológico que varia significativamente durante a sua propagação. Algumas sub-linhas exibem uma morfologia epitelial, enquanto outras apresentam um aspeto fibroblástico. Esta heterogeneidade reflecte a natureza complexa da linha celular e a sua adaptabilidade em diferentes condições de cultura. A presença de alelos p53 normais e mutados nas primeiras passagens sugere que as mutações conferem uma vantagem selectiva de crescimento, levando à predominância de clones mutados ao longo do tempo.

A análise das proteínas de filamentos intermédios da linha celular Hep-70.4 revelou a expressão das queratinas simples K8 e K18, que são típicas das células hepáticas normais, bem como da vimentina e da queratina K19 em graus variáveis. Estes padrões proteicos confirmam a origem hepatocítica da linha celular e a sua classificação como uma linha de hepatoma. A estabilidade genómica da Hep-70.4 foi ainda avaliada através da análise da impressão digital do ADN, que não revelou quaisquer anomalias estruturais importantes, embora tenham sido observadas alterações nas intensidades relativas de determinadas bandas com o aumento do número de passagens.

**Organism**

Rato

**Tissue**

Fígado

**Disease**

Carcinoma hepatocelular

**Synonyms**

HEP-56.1B, 56.1B, 56.1b

**Caraterísticas****Breed/Subspecies**

C57BL/6J

**Age**

Adulto

**Gender**

Feminino

**Morphology**

De tipo epitelial

**Células Hep-56.1B | 400202**

<b>Growth properties</b>	Aderente
--------------------------	----------

**Dados regulamentares**

<b>Citation</b>	Hep-56.1B (número de catálogo Cytion 400202)
-----------------	--

<b>Biosafety level</b>	1
------------------------	---

<b>NCBI_TaxID</b>	10090
-------------------	-------

<b>CellosaurusAccession</b>	CVCL_5767
-----------------------------	-----------

**Dados biomoleculares**

<b>Protein expression</b>	Queratina 8, Queratina 18, Vimentina.
---------------------------	---------------------------------------

<b>Tumorigenic</b>	Sim, em ratinhos C57BL/6J
--------------------	---------------------------

<b>Mutational profile</b>	P53mut (código 277 no exão 8 => Arginina -- Treonina).
---------------------------	--

**Manuseamento**

<b>Culture Medium</b>	DMEM, com: 4,5 g/L de glucose, com: 4 mM de L-Glutamina, com: 3,7 g/L de NaHCO <sub>3</sub> , com: 1,0 mM de piruvato de sódio (número de artigo Cytion 820300a)
-----------------------	--

<b>Supplements</b>	Completar o meio com 10% de FBS
--------------------	---------------------------------

<b>Dissociation Reagent</b>	Accutase
-----------------------------	----------

<b>Subculturing</b>	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.
---------------------	--

<b>Seeding density</b>	1 x 10 <sup>4</sup> células/cm <sup>2</sup>
------------------------	---

## Células Hep-56.1B | 400202

**Fluid renewal** A cada 3 a 5 dias

**Post-Thaw Recovery** Após o descongelamento, coloque as células em placas a uma densidade de  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> e deixe-as recuperar do processo de congelamento e aderir durante pelo menos 24 horas.

**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 x 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<sub>2</sub>, atmosfera humidificada.

## Células Hep-56.1B | 400202

### Flask Coating

Para uma fixação e viabilidade ótimas após a descongelação, recomendamos a utilização de **frascos ou placas revestidos com colagénio**.

### 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.