BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)

National Bank of Stem Cell Lines

IMPRESO DE SOLICITUD DE DEPÓSITO DE UNA LÍNEA

Application Form to Deposit a Human Cell Line

Documentos que se acompañan:
Attached documents:

- ☒ Copia de la autorización de derivación de la línea celular, junto con informe del Comité Ético del centro de procedencia.
  A copy of the authorization for the derivation of the cell line, with the corresponding ethics committee approval
- ☐ Copia de cualquier publicación científica relacionada con la derivación y/o caracterización de la línea.
  A copy of any relevant published scientific papers related to the derivation and/or characterization of the cell line

- ☒ C. V. del investigador principal y C.V. del Co-IP (una página; formato libre).
  A one page CV for the Principal Investigator

- ☒ Otros (especificar):
  Others (specify)
  - Declaración del Representante Legal
  - Consentimiento informado de los embriones y su trazabilidad
  - Copia de autorización de derivación
  - CVs resumido de los investigadores que las han derivado

SECCIÓN 1
Section 1

Información General
General Information

Nombre de la línea: HVR-1
Name of the line: HVR-1

Investigador principal: Guillermo Antiñolo Gil
Principal Investigator:

Co-Investigador principal: Abdelkrim Hmadcha
Co-principal Investigator:

RECEPCIÓN
JUNTA DE ANDALUCIA
CONSEJERÍA DE SALUD
Fundación Progreso y Salud
10/03/09
Registro General
Hora
06 10 Sevilla

Origen de la línea celular:
Origin of the cell line

Embrionario ☒ *Embryonic* **Fetal** ☐ *Fetal* **Adulto** ☐ *Adult*

¿La línea celular ha sido derivada de un embrión con anomalía genética?
Has the cell line been derived from an embryo with genetic anomaly?

NO ☒ *No* **SÍ** ☐ *Yes* (especificar) *(specify)*

Identificación genética de la línea celular. Método y resultado
Genetic identity of the cell line. Method and result

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)

National Bank of Stem Cell Lines

IMPRESO DE SOLICITUD DE DEPÓSITO DE UNA LÍNEA

Application Form to Deposit a Human Cell Line

Documentos que se acompañan:
Attached documents:

- ☒ Copia de la autorización de derivación de la línea celular, junto con informe del Comité Ético del centro de procedencia.
  A copy of the authorization for the derivation of the cell line, with the corresponding ethics committee approval
- ☐ Copia de cualquier publicación científica relacionada con la derivación y/o caracterización de la línea.
  A copy of any relevant published scientific papers related to the derivation and/or characterization of the cell line

- ☒ C. V. del investigador principal y C.V. del Co-IP (una página; formato libre).
  A one page CV for the Principal Investigator

- ☒ Otros (especificar):
  Others (specify)
  - Declaración del Representante Legal
  - Consentimiento informado de los embriones y su trazabilidad
  - Copia de autorización de derivación
  - CVs resumido de los investigadores que las han derivado

SECCIÓN 1 — **Información General**
Section 1 — *General Information*

Nombre de la línea: HVR-1
Name of the line: HVR-1

Investigador principal: Guillermo Antiñolo Gil
Principal Investigator:

Co-Investigador principal: Abdelkrim Hmadcha
Co-principal Investigator:

Origen de la línea celular:
Origin of the cell line

Embrionario ☒ *Embryonic* **Fetal** ☐ *Fetal* **Adulto** ☐ *Adult*

¿La línea celular ha sido derivada de un embrión con anomalía genética?
Has the cell line been derived from an embryo with genetic anomaly?

NO ☒ *No* **SÍ** ☐ *Yes* (especificar) *(specify)*

Identificación genética de la línea celular. Método y resultado
Genetic identity of the cell line. Method and result

SECCIÓN 2
Section 2

Datos del Depositante
Applicant Details

Investigador Principal: *Principal Investigator:* Guillermo Antiñolo Gil	**Dirección Postal:** *Postal address:* Avda Manuel Siurot s/n 41013- SEVILLA
Centro de Trabajo: *Institution:* Hospital Universitario Virgen del Roció Unidad de Gestión Clínica de Genética Reproducción y Medicina Fetal	**Teléfono** *(phone)*: (+34) 955 012 725 **Fax:** (+34) 955 013 292 **E-mail:** guillermo.antinolo.sspa@juntadeandalucia.es

Co-Investigador Principal: *Co-Principal Investigator:* Abdelkrim Hmadcha	**Dirección Postal:** *Postal address:* Avda, Americo Vespucio s/n Isla de la cartuja - 41092 Sevilla
Centro de Trabajo: *Institution:* CABIMER - Departamento de Terapia Celular y Medicina Regenerativa	**Teléfono** *(phone)*: (+34) 954 468 004 **Fax:** (+34) 954 461 664 **E-mail:** karim.hmadcha@cabimer.es

SECCIÓN 3
Section 3

Datos de la Línea Celular
Details of Cell Line

Tipo de muestra biológica (especificar estadio embrionario, semanas de gestación,...)
Kind of biological sample (specify embryonic stage, weeks of pregnancy,...)

Preembrión procedente del programa de Fecundación in vitro, Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal de los HH. UU. Virgen del Rocío: Preembrión humano congelado en día +3 de desarrollo mediante protocolo estándar de congelación lenta.

Human pre-embryo obtained from the IVF program of the Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal (UGC) de los HH. UU. Virgen del Rocío and collected after being donated by patients through an informed consent process: pre-embryo frozen at day +3 following the UGC standard protocol.

Muestra biológica
Biological simple

Blastocisto
Blastocyst

Fresco ☐
Fresh

Crioconservado ☒
Cryopreserved

Fecha de la obtención del muestra biológica *Date of obtaining the biological sample* 16/05/06	**Fecha del uso o descongelación** *(si congelado)* *Date used or thawed (if frozen)* 11/01/2008
Fecha de la donación del muestra biológica *Date of donation of the biological sample* 23/01/07	

Descripción general del procesamiento previo del muestra biológica utilizado (cultivo embrionario, procesamiento muestra fetal o de tejido adulto)
General description of the processing of the biological sample used (embryonic culture, processing of fetal sample or of adult tissue).

Con fecha 16/05/2006 a la pareja progenitora del preembrión del que se ha obtenido esta línea celular se le realizó un ciclo de Fecundación In Vitro (FIV) dentro del programa de FIV de la Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal de Hospitales Virgen del Rocío de Sevilla. Se obtuvieron 14 preembriones, de los cuales 9 fueron criopreservados mediante congelación lenta según el protocolo de congelación Freeze kit 1^{TM} de Vitrolife® (Kungsbacka, Suecia). El 23/01/2007 la pareja dona sus preembriones criopreservados al proyecto de investigación *"Derivación de Líneas de células Troncales Embrionarias Humanas de Preembriones Afectos de Enfermedades Genéticas Obtenidos Tras Diagnóstico Genético Preimplantatorio"*, firmando los Consentimientos necesarios. El preembrión del cual se ha obtenido esta línea celular fue descongelado según el protocolo comercial de descongelación Thaw Kit 1^{TM} de Vitrolife®. El preembrión que se encontraba en día 3 de desarrollo (estadio de células) se cultivó en medio G2 de la serie GIII de Vitrolife® (Kungsbacka, Suecia), según descrito para cultivo de preembriones en dicho estadio, hasta llegar a estadio de blastocisto, en su día 5 de desarrollo.

La inclusión de preembriones procedentes del programa de Fecundación in vitro en el proyecto TCRM 0021/2006, tiene como objetivo establecer líneas de CTEhs cuyo método de obtención sea idéntico al de las líneas CTEhs a partir de prembriones afectos de enfermedades monogénicas, eliminando los errores de variabilidad que tendríamos si como línea CTEhs control usáramos alguna de las que han sido ya derivadas y se ofertan para su utilización, generadas con una metodología diferente a la nuestra o bien desconocida.

Preembryos were obtained as donation from an infertile couple undergoing in vitro fertilization (IVF) treatment at Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal (UGC) de los HH. UU. Virgen del Rocío in Seville.They signed an informed consent form. Fourteen preembryos were obtained, and nine of them were donated. The nine preembryos were frozen at the cleavage state using slow freezing method Freeze kit 1^{TM}, Vitrolife® (Kungsbacka, Suecia). All of them were thawed using Thaw Kit 1^{TM}, Vitrolife® and cultured to blastocyst stage using G2 medium (GIII series, Vitrolife®).
With the inclusion of preembryos from our IVF program in the TCMR 0021/2006 research project is expected to obtain CTEh lines as controls. Using identical conditions in the derivation method for control lines and for CTEh lines derived from preembryos afected of monogenic disorders, we can reduce bias and carry out a prospective comparison.

En caso de muestra embrionaria, indicar si se utilizaron blastómeros o células de la masa celular interna y el método de aislamiento utilizado
If of embryonic origin, indicate whether blastomeres or internal cell mass were used, as well as the isolation method

Se aisló la masa celular interna (ICM) mediante microcirugía de forma manual bajo estereomicroscopio en un pocillo con medio K-SR, cuando el preembrión se encontraba en estadio de blastocisto "hatching". Para ello, se utilizaron dos agujas de insulina estériles (25G). Con una se sujetó el preembrión por el trofoectodermo presionando sobre el fondo de la placa y con la otra se separó la ICM del trofoectodermo. La ICM se pasó varias veces por una pipeta pasteur estirada a la llama de diámetro similar, para eliminar los restos de trofoectodermo y se sembró y co-cultivó sobre una capa de fibroblastos inactivados con mitomicina C, en medio de cultivo de las células troncales embrionarias humanas (CTEh): ver la composición del medio en el siguiente apartado.

Inner Cell Mass (ICM) was mechanically isolated under estereomicroscope using 2 insulin syringe (25G) at "hatching blastocyst" stage. After several pipetting using a Pasteur pipette, the ICM-containing part was plated onto mitomycin-C inactivated fibroblasts dishes. Media formulation is detailed below.

Origen del soporte celular o acelular utilizado para la derivación, así como de los componentes de los medios de cultivo (si se describen en publicación, indicar además referencia)
Origin of the cellular or cellular free support used in derivation in addition to the components of the culture mediums (if they are described in a publication, please indicate the reference).

Soporte celular utilizado fue fibroblastos fetales humanos (American Type Cultura Collection: CRL-2429).
Medio de cultivo: Knockout Dubelcco´s modified Eagle´s medium supplemented with 2 mM Glutamine (Gibco, Invitrogen corporation), 0.1mM 2-mercaptoethanol (Gibco, Invitrogen corporation), 8 ng/ml basic fibroblasto growth factor (bFGF) (R&D Systems), 1% non-essential amino acids (Gibco, Invitrogen corporation), 20% Knockout Serum Replacement (Gibco, Invitrogen corporation) and 50U/ml-50mg/ml Penicillin-Streptomycin (Gibco, Invitrogen corporation).

Human foreskin from the American Type Cultura Collection: CRL-2429 were used as feeders.
Cell culture Medium used: Knockout Dubelcco´s modified Eagle´s medium supplemented with 2 mM Glutamine (Gibco, Invitrogen corporation), 0.1mM 2-mercaptoethanol (Gibco, Invitrogen corporation), 8 ng/ml basic fibroblasto growth factor (bFGF) (R&D Systems), 1% non-essential amino acids (Gibco, Invitrogen corporation), 20% Knockout Serum Replacement (Gibco, Invitrogen corporation) and 50U/ml-50mg/ml Penicillin-Streptomycin (Gibco, Invitrogen corporation).

Descripción de las características morfológicas de la línea en cultivo (forma y tamaño colonias; forma y tamaño células; ratio núcleo/citoplasma; otros)

Description of the morphological characteristics of the line in culture (form and size of the colonies; form and size of the cells; nucleus/cytoplasm ratio; others)

Las células crecen en colonias y presentan un núcleo predominante (80%) característico de las células troncales embrionarias.

Colony growth and cells with predominant nucleus (80%), characteristics of hESC.

Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)

Microbiological controls carried out (indicate in detail)

El control microbiológico, es una práctica rutinaria que se realiza en la unidad de cultivo de las CTE de CABIMER. Durante los 3 años que llevamos trabajando en esta unidad, nunca se han dado incidencias de contaminación. En cuanto a los controles realizados durante distintas fases del cultivo celular, los ensayos realizados son:
1.- Control de esterilidad: El ensayo de esterilidad se realiza en condiciones asépticas, pero las precauciones tomadas para evitar la contaminación no deben afectar a los microorganismos cuya presencia deba ponerse de manifiesto en el ensayo. Los medios de cultivo para el ensayo son medios comerciales a los que previamente se les ha realizado un control de esterilidad por lote recibido. Los medios utilizados en el ensayo de esterilidad son el caldo de tioglicolato, para la detección de bacterias anaerobias, aunque también permite detectar bacterias aerobias, y el caldo de peptona de caseína y de soja para el cultivo de bacterias aerobias, pero también apropiado para hongos. Las muestras son inoculadas e incubadas durante 14 días a las temperaturas apropiadas para cada medio, se observa el cultivo varias veces durante el periodo de incubación.

2.- Detección de micoplasma: Se ha testado la presencia de micoplasmas en los cultivos de la línea CTEh como de los fibroblastos (HEFs) siguiendo dos protocolos de diferentes casas comerciales.
Por un lado, se utilizó MycoAlert Micoplasma Detection Kit (LONZA), basado en un método bioquímico que detecta la actividad de ciertos enzimas micoplasmáticos mediante luminometría con muestras celulares tras nueve días en cultivo. El resultado fue negativo para ambas muestras.
Por otro lado, se utilizó Venor®GeM (Minerva biolabs), basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), método de elección por su alta sensibilidad en la detección de contaminación por Micoplasma y Acholeplasma en cultivos celulares, con las muestras las mismas muestras tras cinco días en cultivo. De nuevo, el resultado fue negativo para ambas muestras.

The microbiological controls were carried out following the GLP procedures established in the cell culture unit, two tests were performed:

1- Microorganism detection control.
2- Micoplasma detection.

The results were negative

Mantenimiento de la línea: *Line maintenance:*	Se realiza un cambio diario de medio *Cell culture medium was changed every single day*
Ratio de pase: *Passage ratio:*	El periodo entre pases es 6-7 días *Passage was carried out each 6-7 days*
Método de pase: *Passage method:*	Los pases se realizan de forma mecánica *Passage was carried out each 6-7 days*

	si *Yes*	**no** *No*
Xenobióticos *Xenobiotics*		X

Marcadores: La caracterización de la línea se llevo a cabo a distintos pases (P6-P10 y P40-P50)
Markers: *The in Vitro characterization was carried out at different passages (P6-P10 y P40-P50)*

	Método (ARN/proteínas) *Method (RNA/proteins)*	**nº pase** *Passage n.*	**resultado** *results*	**comentarios** *comments*
Oct 4	RT-PCR/ Inmunofluorescencia		+	
Nanog	RT-PCR		+	
Rex 1				No realizado
Sox 2	RT-PCR		+	
SSEA3				
SSEA4	Inmunofluorescencia / citometría de flujo		+	
TRA-1-60	Inmunofluorescencia		+	
TRA-1-81	Inmunofluorescencia		+	
Telomerasa	RT-PCR		+	
Fosfatasa Alk.	Kit Tinción – SIGMA ALDRICH®		+	
Cariotipo	Bandas G	P46	46, XY	
Otros / *Others*	(HLAs RT-PCR)		+	

Capacidad de diferenciación
Differentiation capacity

	Ectodermo/ *Ectoderm*			**Endodermo/***Endoderm*			**Mesodermo/** *Mesoderm*		
	marcador *marker*	**pase** *passage*	**resultado** *result*	**marcador** *marker*	**pase** *passage*	**resultado** *result*	**marcador** *marker*	**pase** *passage*	**resultado** *result*
In Vitro *In vitro*	**Isl-1**	(P46)	+	**α-fetoproteina**	(P46)	+	**BMP4**	(P46)	+
				Sox17	(P46)	+			

In vivo/ *in vivo*

Método: Inyección intratesticular de CTEh en ratones inmunodepremidos NOD-SCID Beige

Resultado: teratomas en los que se objetivan los distintos componentes tisulares derivados de las distintas hojas embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo.
Se reconoce epitelio plano poliestratificado inmaduro semejante a la epidermis fetal.
Se observa componente neural inmaduro, cartílago, músculo liso y glándulas inmaduras que se asemejan al intestino primitivo.

Method: injection of undifferentiated hESC into SCID-beige, to generate teratomas.

Results: *derivatives from the three germ layers were detected.*

Descripción de las características de diferenciación *in Vitro*
Description of the differentiation characteristics in vitro

Para la diferenciación *in vitro* se recurre a la formación de cuerpos embrionarios. La obtención de los cuerpos embrionario humanos se realiza en gota pendiente durante dos días seguida de un cultivo masivo en placas tratadas con gelatina, después de 14 días de cultivo en medio sin FGF se extrae el ARN para detectar la expresión de los marcadores de las 3 capas germinales: (i) ectodermo (ii) mesodermo y (iii) endodermo.

For the in vitro differentiation study, embryoid bodies (EB) were cultured in hanging drop for 2 days in suspension and then transferred onto gelatin-coated dishes and cultured for an additional 10–14 days. Total RNA was extracted for RT-PCR, to assess the expression of markers associated with differentiation of the 3 germ layers.

Datos de la determinación de pluripotencialidad *in vivo* o formación de teratomas
Data of the pluripotentiality determination in vivo or teratoma formation

A las 6-8 semanas de inocular las CTEh indiferenciadas en ratones inmunodepremidos NOD-SCID Beige, se formaron teratomas. En los teratomas se objetivan los distintos componentes titulares derivados de las distintas hojas embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo. Se reconoce epitelio plano poliestratificado inmaduro semejante a la epidermis fetal, componente neural inmaduro, cartílago, músculo liso y glándulas inmaduras que se asemejan al intestino primitivo.

In vivo differentiation studies were carried out by the generation of teratomas via injection of undifferentiated hESC into SCID-beige. 6 to 8 weeks later, the teratomas were processed and the three germ layers (Endoderm, Mesoderm and Ectoderm) derivatives were detected.

Datos de la tipificación HLA
HLA typification data

La línea expresa: HLA-A; HLA-B y HLA-C a nivel de mensajero (RT-PCR)
HLA-A; HLA-B and HLA-C were detect by RT-PCR

Consistencia celular tras 6 pases de congelación y descongelación. Resultados.
Cell consistency alter 6 passages of freezing and thawing.

La línea preserva todas sus características de CTEh, tras varios ciclos de congelación/descongelación (> 6 pases).
Cryopreservation of hESC colonies was successfully performed, The thawing and freezing protocol was carried out over 6 passages.

Pase en el momento del registro
Passage at the time of the recording

La línea se encuentra actualmente en el pase P-53.
This human ESC, have reach passage P-53.

¿Ha sido la línea modificada genéticamente? *Has the line been genetically modified?*	**¿Se llevó a cabo un análisis clonal?** *Has a clonal analysis been carried out?*
Sí *Yes* ☐ **No** *No* ☒	**Sí** *Yes* ☐ **No** ☒ **Resultado** */ Result*
Comentarios/ *Comments*:	

Otras observaciones o información relevantes (a juicio de los Investigador Principal):
Other observations or relevant information (to the discretion of the Principal Investigators):

Listado del personal investigador que ha participado en el proceso:

1- Criopreservación y Descongelación de los preembriones y Aislamiento de la ICM:
   - Mª Dolores Lozano Arana (HUVR)
   - Cristina Moya de Alarcón (HUVR)

2- Mantenimiento y Caracterización:
   - Yolanda Aguilera García (CABIMER)
   - Nuria mellado Damas (CABIMER)

3- Cariotipo
   - Javier Sánchez García (HUVR)

4- Diferenciación "in-vivo"
   - Luís Sánchez Palazón (CABIMER)
   - Yolanda Aguilera (CABIMER)

5- Análisis histológico
   - José Palacios Calvo (HUVR)

Otras observaciones o información relevantes (a rellenar por el BNLC):
Other comments or relevant information (to be completed by BNLC)

N/A.

Seguimiento de la línea (a rellenar por el BNLC):
Follow up of the line (to be completed by BNLC)

SECCIÓN 4 Declaración

Confirmo que la información contenida en estos impresos es cierta y asumo total responsabilidad sobre la misma.
I confirm that the information contained in this form is true and I assume total responsibility for it.

Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre *(Representante legal del Departamento/Centro)* Juan Jesús Bandera González Fecha/ Date: 09/03/09	**Firma del Investigador Principal/ Co- Investigador Principal/** *Signature of the Principal Investigator/ Co-investigador* Guillermo Antiñolo Abdekerim Hmadcha Fecha /Date 09/03/09
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: *Name and Position of the Person Representing the Centre:* Juan Jesús Bandera González, Director Gerente, Fundación Progreso y Salud	
Dirección Postal: *Postal Address:* Avda. Américo Vespucio, nº5 bloque 2º-2º Isla de la Cartuja 41092 Sevilla	**Teléfono /***Telephone***:** 955040450 **Fax:** 955040457 **E-mail:** juanjesus.bandera@juntadeandalucia.es

INFORME DE TRAZABILIDAD LINEA HVR-1

❑ Generación de la muestra biológica

Con fecha 16/05/2006, a la pareja progenitora del preembrión del que se ha obtenido esta línea celular se le realizó un ciclo de Fecundación In Vitro (FIV) dentro del programa de FIV de la Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal de Hospitales Virgen del Rocío de Sevilla. Se obtuvieron 15 ovocitos maduros de la paciente los cuales fueron fecundados mediante inyección intracitoplasmática con espermatozoides de donante (número de identificación del donante:18755 del Centro de estudio e investigación de la fertilidad (Ceifer)). Como resultado se obtuvieron 14 preembriones.

❑ Conservación de la muestra biológica.

Con fecha 19/05/2006 se criopreservaron 9 preembriones en estadio de células (tercer día de desarrollo) mediante congelación lenta según el protocolo de congelación Freeze kit 1^{TM} de Vitrolife Vitrolife® (Kungsbacka, Suecia). Se utilizaron pajuelas de congelación embrionaria Paillete CBS Embryo 0.3 ml de Cryo Bio System® (L´AIGLE, France), con los siguientes números de identificación: P1MJCH1847452, P2MJCH1847452, P3MJCH1847452 y P4MJCH1847452.

❑ Donación de la muestra biológica.

El 23/01/2007 la pareja acude a la UGC de Genética, Reproducción y Medicina Fetal para donar todos sus preembriones criopreservados a un proyecto de investigación, firmando el Consentimiento informado para la donación de preembriones humanos crioconservados a proyectos de investigación y el Consentimiento de los progenitores para la utilización de preembriones con fines de investigación a cargo del proyecto *"Derivación de Líneas de células Madre Embrionarias Humanas de Preembriones Afectos de Enfermedades Genéticas Obtenidos Tras Diagnóstico Genético Preimplantatorio"*

❑ Descongelación de la muestra biológica.

El 11/01/2008 se descongelaron las pajuelas con identificación P3MJCH1847452 y P4MJCH1847452 que contenían cada una 2 preembriones. Los preembriones se cultivaron en microgota con medio G2 de la serie G III de Vitrolife®. A los embriones se les identificó con las siglas MAJOC 1, MAJOC 2, MAJOC 3 y MAJOC 4.

❑ Proceso de aislamiento de la masa celular interna.

El 13/01/2008 los preembriones MAJOC 1, MAJOC 2 y MAJOC 3 alcanzaron el estadio de blastocisto y se procedió al aislamiento de la masa celular interna (ICM).

MAJOC 1 se encontraba en estadio de blastocisto expandido que no presentaba una ICM definida, por lo que el blastocisto se sembró completo. No se obtuvieron resultados.

MAJOC 2 se encontraba en estadio de blastocisto hatching y MAJOC 3 en estadio de blastocisto expandido. Ambos presentaban una ICM apreciable y bien definida y se les realizó el aislamiento de la ICM mediante procedimiento mecánico.

Todo el proceso se realizó de forma manual bajo estereomicroscopio. El blastocisto se lavó en un pocillo con 500µl de medio K-SR y se pasó a otro pocillo limpio con el mismo medio donde se realizó el aislamiento de la ICM. Para esta microcirugía se utilizaron dos agujas de insulina estériles (25G). En primer lugar se introdujeron las agujas unos segundos en el medio, alejadas del preembrión, para que éste no fuera succionado por capilaridad. Una vez estabilizadas las agujas, una de ellas se utilizó para sujetar el preembrión por el trofoectodermo presionando sobre el fondo de la placa. La otra aguja se utilizó para cortar, separando la ICM del trofoectodermo. Una vez separada, la ICM se pasó varias veces por una pipeta pasteur estirada a la llama de diámetro similar, con objeto de eliminar los posibles restos de trofoectodermo que hubieran podido quedar.

Con la pipeta pasteur se trasladó la ICM ya aislada a la placa de fibroblastos humanos inactivados con mitomicina C en medio de cultivo de las células troncales embrionarias humanas (CTEh). Se utilizó una placa de estas características para cada preembrión, perfectamente identificada con el nombre del blastocisto. A las 48 horas se comprobó que la ICM del preembrión MAJOC 2 estaba fijada. Se observó crecimiento de forma diaria hasta que el día 25/01/2008 se realizó el primer pase de esta línea celular.

En Sevilla, a 9 de marzo de 2009

EL INVESTIGADOR PRINCIPAL

H.U. Virgen del Rocío - H. de la Mujer
Director U.G.C. Genética, Reproducción y Medicina Fetal.
Jefe Servicio Ginecología y Obstetricia.

Fdo.: Guillermo Antiñolo Gil

Fdo.: Dr. Guillermo Antiñolo Gil

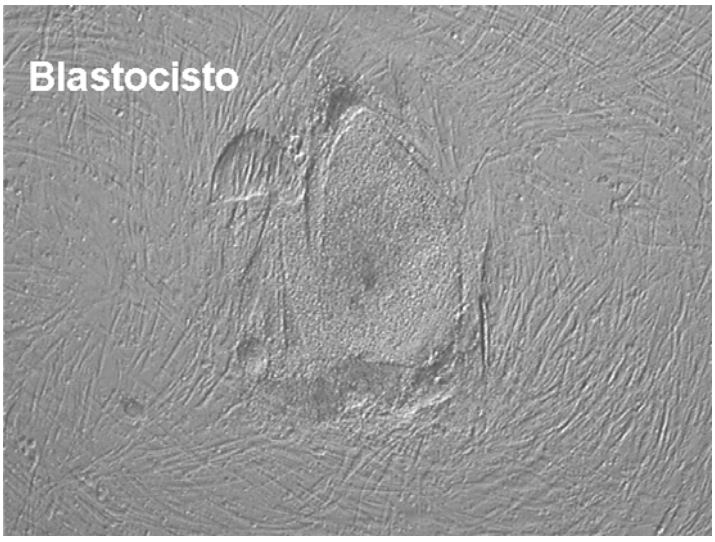
I- Derivación

El preembrión del cual se ha obtenido esta línea celular fue descongelado según el protocolo comercial de descongelación Thaw Kit 1^{TM} de Vitrolife®. El preembrión que se encontraba en día 3 de desarrollo se cultivó en medio G2 de la serie GIII de Vitrolife® (Kungsbacka, Suecia), según descrito para cultivo de preembriones en dicho estadio hasta llegar a estadio de blastocisto en su día 5 de desarrollo.

II- Cultivo y Pases

Una vez sembrado el blastocisto y tras doce días de cultivo se realizó el primer pase utilizando como suporte celular *"Feeders"* fibroblastos fetales humanos inactivados.

Para asegurar el mantenimiento de la línea, además de realizar semanalmente un pase mecánico se congela 1 o 2 viales de la línea.



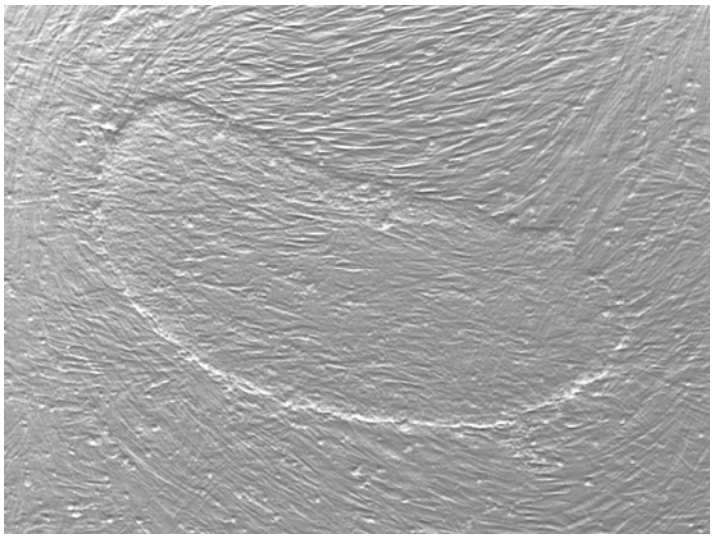
Aspecto del blastocisto cultivado sobre fibroblastos humanos inactivados

III- Caracterización de HVR-1

Se realiza una caracterización periódica de esta línea

III.1- Fenotipo

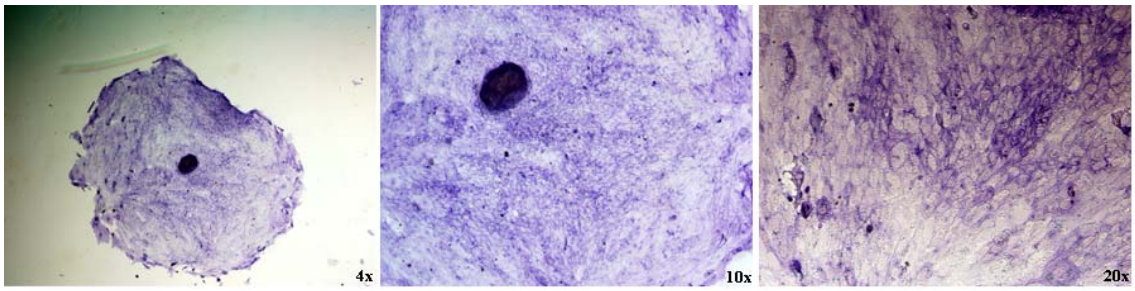
La línea presenta una morfología de colonia indiferenciada, las células de las colonias presentan un núcleo grande característico de la CTE.



Morfología de una colonia de CTE HUR-1 cultivada sobre fibroblastos humanos inactivados

III.2- Fosfatasa Alcalina

La tinción con fosfatasa alcalina nos muestra una colonia teñida de azul/morado indicador del estado de indiferenciado de la línea HVR-1.



Fotos a distintos aumentos mostrando la detección de la fosfatasa alcalina

III.3- Marcadores de pluripotencialidad

La expresión de los marcadores se analizo mediante las siguientes técnicas de Biología Molecular:

1- RT-PCR.

Se realizó una RT-PCR de los marcadores de indiferenciación *Oct-4*, *Nanog*, *Sox-2* y utilizando como control interno *β-Actina*.

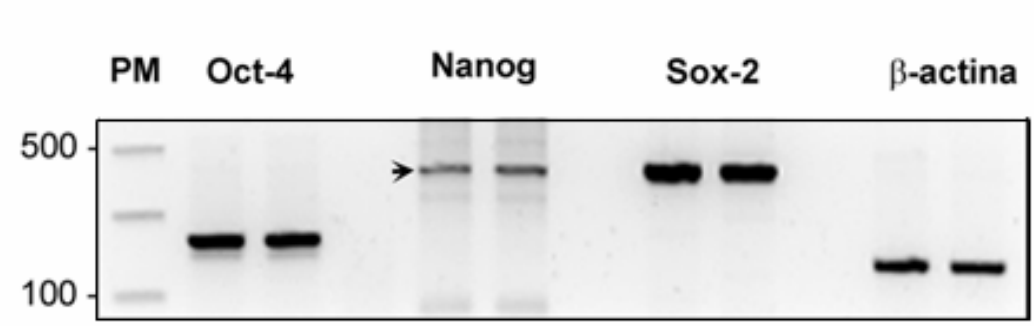
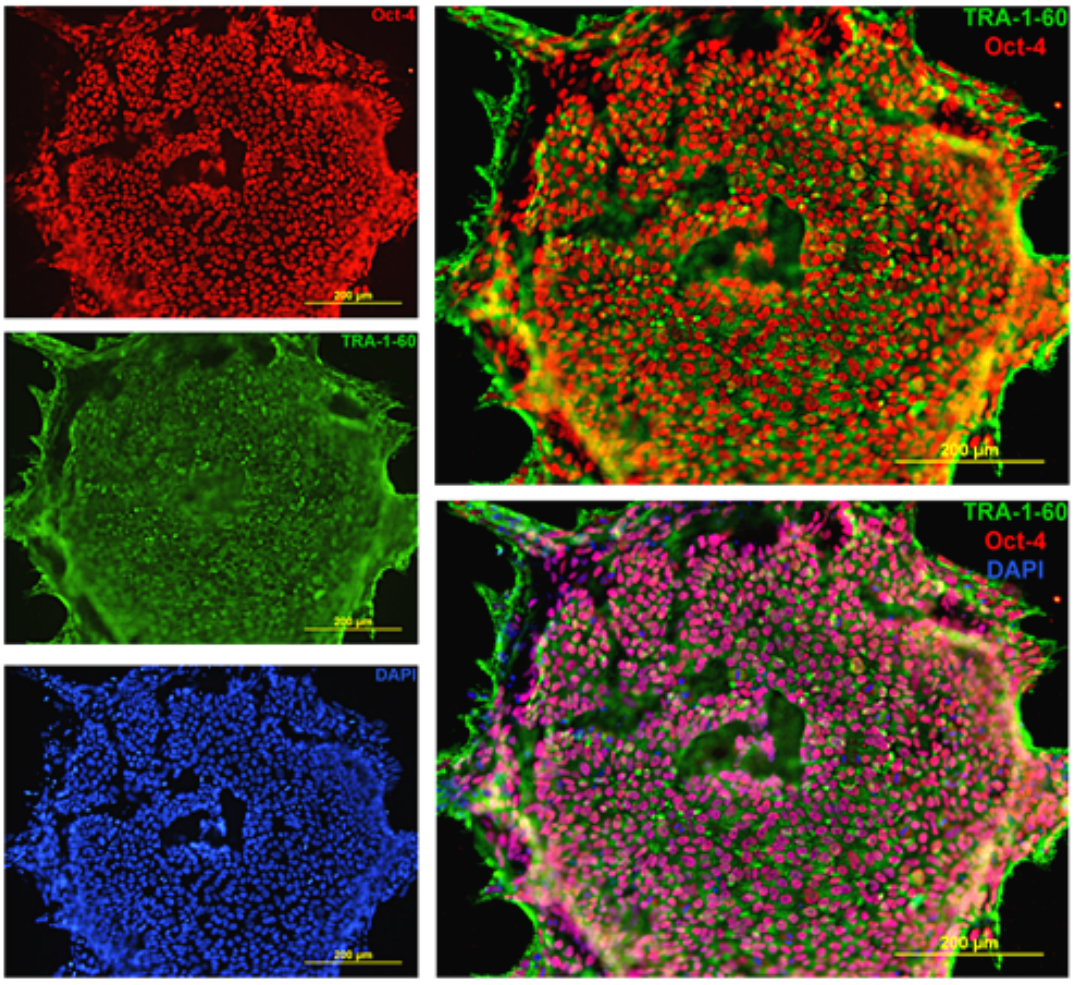


Foto de un Gel de agarosa (Br-Et) mostrando los productos de amplificación por RT-PCR relativos a la detección de los principales genes de pluripotencialidad

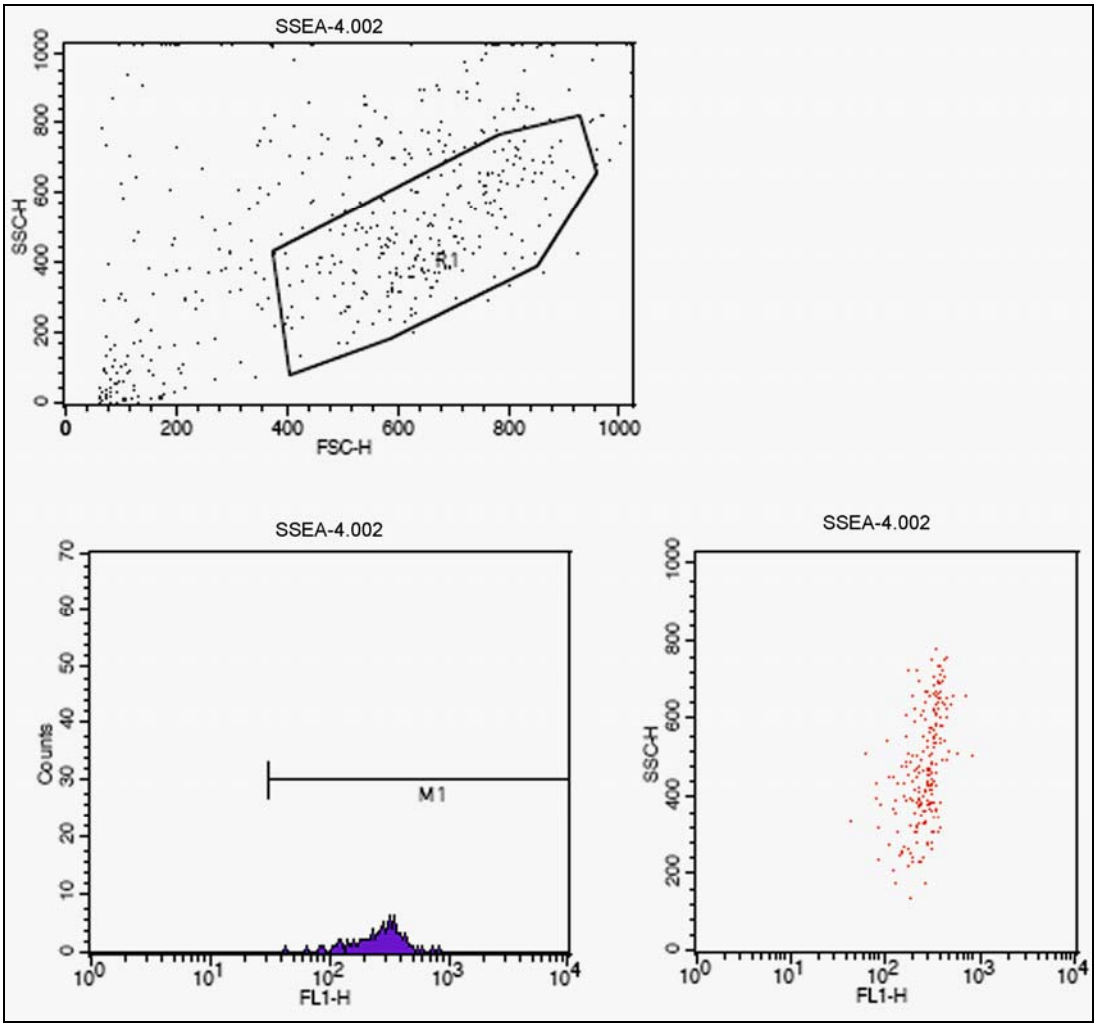
2- Inmunofluorecencia

La expresión de antígenos de superficie así como nucleares fue analizada empleando técnicas de inmunofluorescencia. Presentamos los resultados de la detección utilizando anticuerpos monoclonales TRA-1-60 (de superficie) y Oct-4 (nuclear).



Expresión de Oct-4 y TRA-1-60 por inmunofluorecencia

3- Citometría de flujo (SSEA-4)

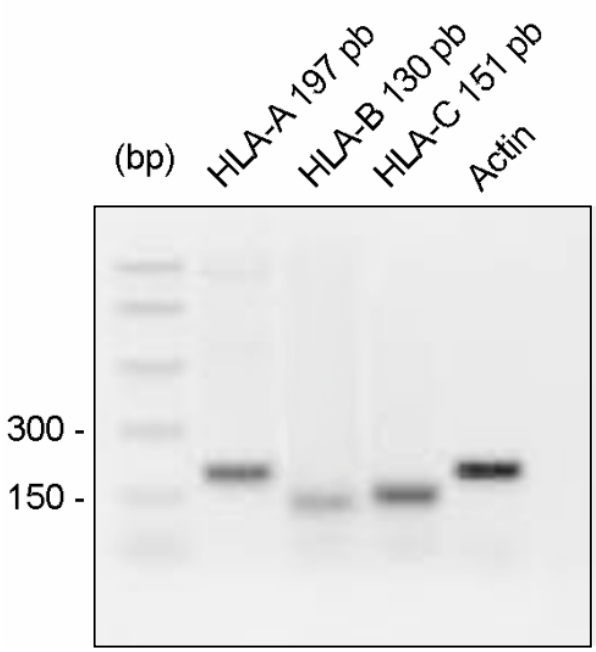


File: SSEA-4.002 Acquisition Date: 20-Feb-09
Gate: G1 Gated Events: 217
Total Events: 495

Marker	Events	% Gated	% Total
All	217	100.00	43.84
M1	217	100.00	43.84

Análisis de la población de células que expresan SSEA-4 por citometría de flujo

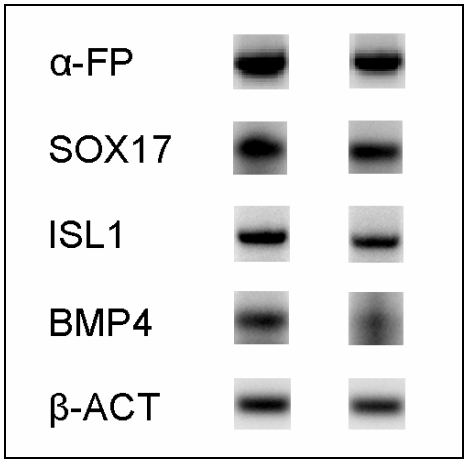
IV.- Expresión HLA



Expresión de los distintos isotipos HLA por RT-PCR

V.- Diferenciación espontánea *"in vitro" de HVR-1*

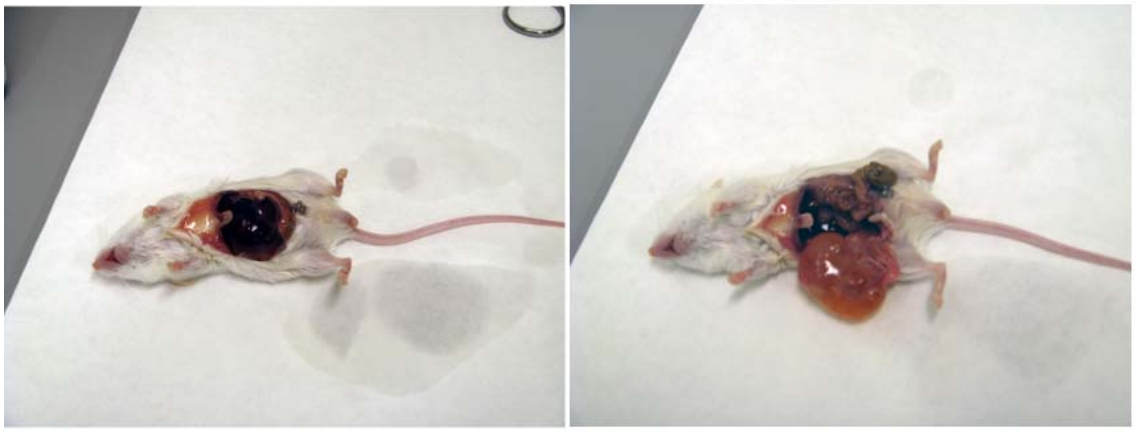
Se llevó a cabo un protocolo de diferenciación espontánea mediante cultivo masivo sobre Matrigel con medio KSR sin hrbFGF. Se realizó cambio de medio en días alternos durante 14 días. A continuación se extrajo ARN para analizar la expresión de algunos marcadores de diferenciación. Los resultados se muestran por duplicado, como puede observarse: tras una diferenciación espontánea, la línea celular HVR-1 expresa marcadores para las tres capas embrionarias: endodermo (α-fetoproteina y Sox17), ectodermo (Isl1) y mesodermo (BMP4).



Expresión de los marcadores de diferenciación hacia la 3 capas germinales por RT-PCR

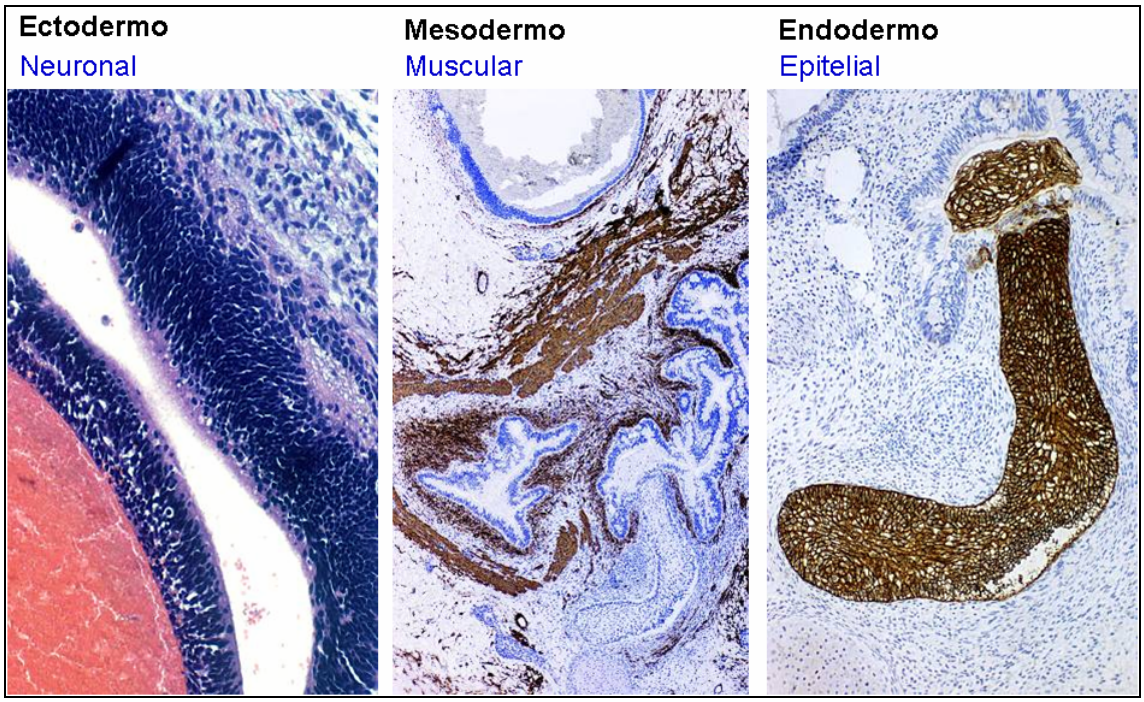
VI.- Diferenciación espontánea *"in vivo" de HVR-1*

Los ratones inoculados con las CTEhs HVR-1 y que mostraron alteraciones macroscópicas, fueron sacrificados a las 6 semanas de tratamiento. En el proceso de disecado pudimos apreciar unas masas globosas (Teratomas con fluido quístico) que fueron utilizadas para un análisis histológico con el fin de detectar las capas germinales.



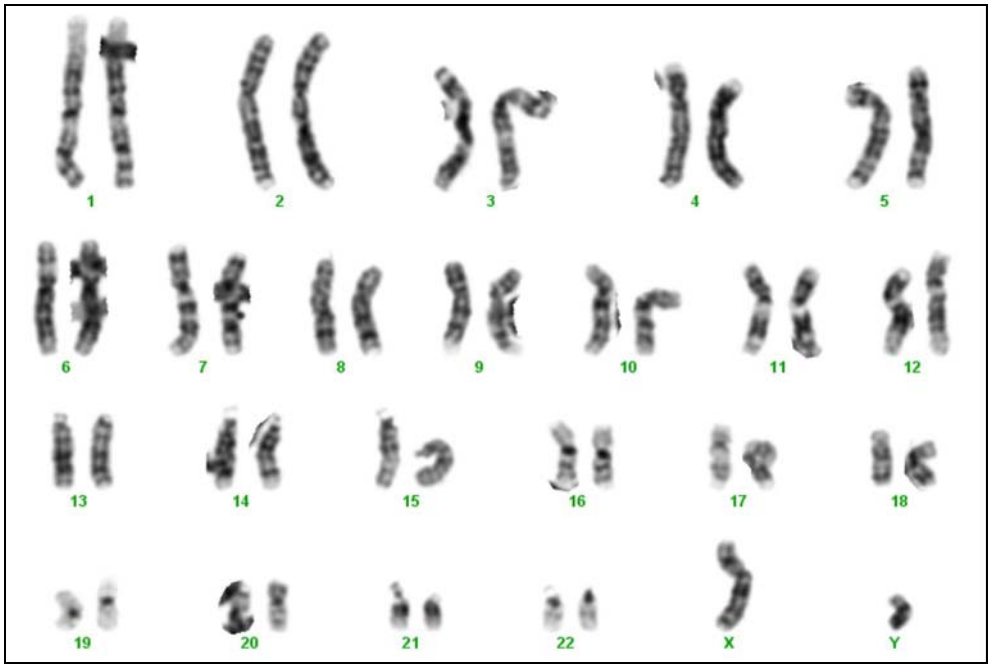
Extirpación del teratoma de un ratón beige NOD-SCID

Aspecto del teratoma extirpado



Diferenciación in vivo de la línea HVR-1. Examen histopatológico de los teratomas mostrando células de las tres capas germinales

VII.- Estabilidad genética y Cariotipo



Cariotipo normal (46 XY)

VII.- Test de esterilidad

Se ha testado la presencia de micoplasmas en los cultivos de la línea troncal embrionaria humana siguiendo dos protocolos de diferentes casas comerciales.

Por un lado, se utilizó MycoAlert Micoplasma Detection Kit (LONZA), basado en un método bioquímico que detecta la actividad de ciertos enzimas micoplasmáticos mediante luminometría. Si estos enzimas no están presentes en las muestras, la segunda lectura no muestra incremento respecto a la primera, como puede observarse en la tabla, la muestra celular (HVR-1) ha dado lugar a un resultado negativo.

	1ª Lectura	2ª Lectura	Resultado
Control negativo	1.119e+04	1265	-
HVR-1	6240	1819	-
Control positivo	5306	4.42e+05	+

Por otro lado, se utilizó Venor®GeM (Minerva biolabs), basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), método de elección por su alta sensibilidad en la detección de contaminación por Micoplasma y Acholeplasma en cultivos celulares, con las muestras HVR-1. De nuevo, el resultado fue negativo para las muestras.

Marcador (150 y 130 pB)

HVR-1 (P48)

HVR-1 (P47)

HVR-1 (P45)

HVR-1 (P44)

Control Positivo

Control Negativo

Resultados del test de detección de micoplasmas con el kit Venor®GeM en distintos pases de cultivo

Resumen:

CARACTERIZACION DE LA LÍNEA HVR-1

CARACTERISTICAS	
Pase nº	53
Feeders	HUMAN FORESKIN FIBROBLASTS
Cariotipo	46,XY
Fenotipado	
Inmunohistoquímica	
SSEA-1	-
SSEA-4	+
TRA1-60	+
TRA1-81	+
Oct 4	+
Sox 2	+
PCR	
Oct 4	+
Sox2	+
Nanog	+
Tert	+
Fosfatasa alcalina	+
Citometría	
SSEA-4	+
Viabilidad congelación/descongelación	SI
Pluripotencialidad	
In vivo	SI
In Vitro	
Ectodermo (Isl-1)	+
endodermo (α-fetoproteína)	+
mesodermo (BMP4)	+
Análisis microbiológico	
Micoplasma	-
Tipificación HLA	
HLA-A	+
HLA-B	+
HLA-C	+