

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™ 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 criopreservados 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.: Dr. Guillermo Antifolo Gil

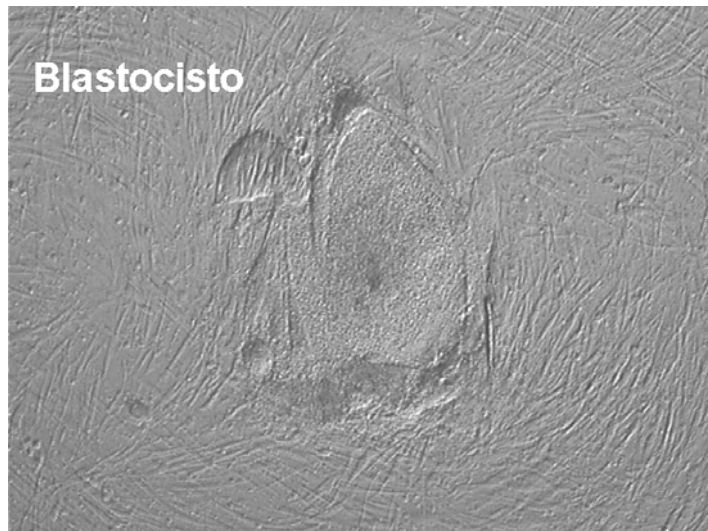
I- Derivación

El preembrión del cual se ha obtenido esta línea celular fue descongelado según el protocolo comercial de descongelación Thaw Kit 1™ 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 soporte 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.



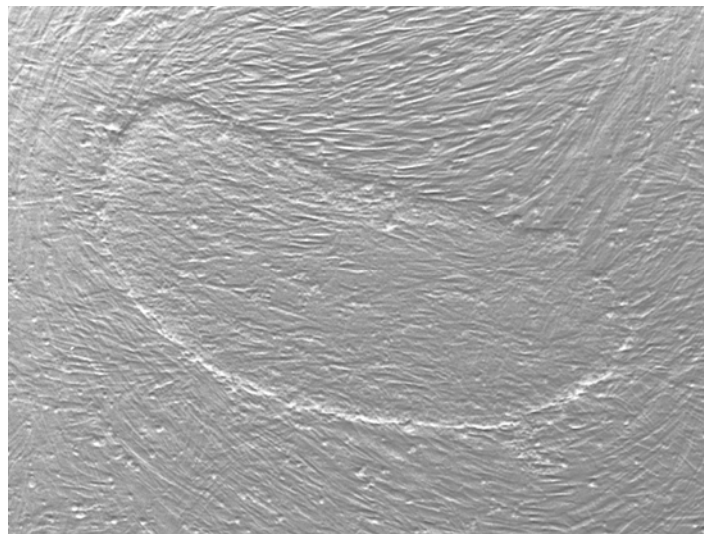
Aspecto del blastocisto cultivado sobre fibroblastos humanos inactivados

III- Caracterización de HVR-1

Se realiza una caracterización periódica de esta línea

III.1- Fenotipo

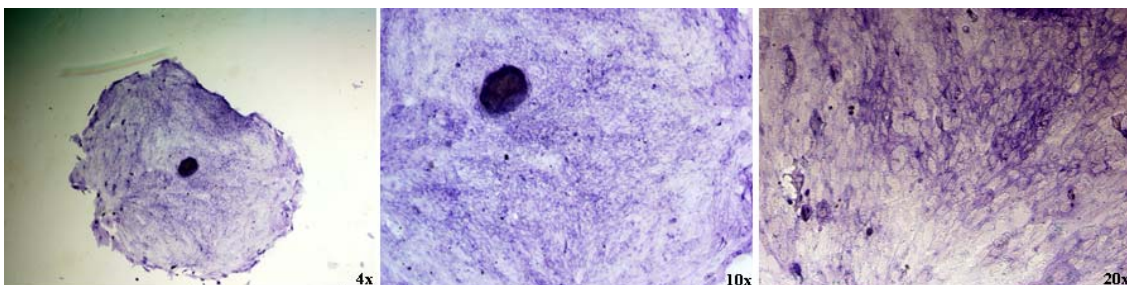
La línea presenta una morfología de colonia indiferenciada, las células de las colonias presentan un núcleo grande característico de la CTE.



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 analizó 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*.

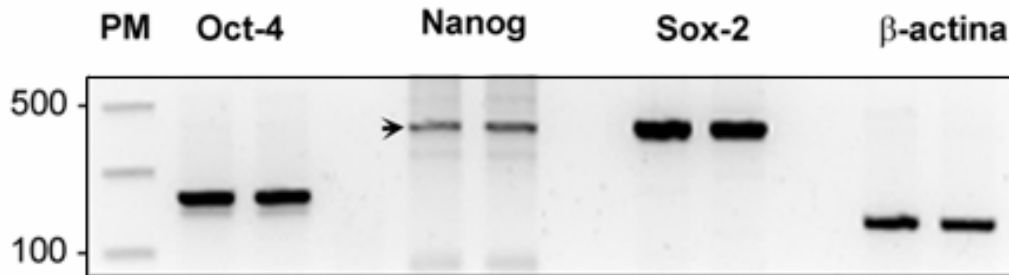
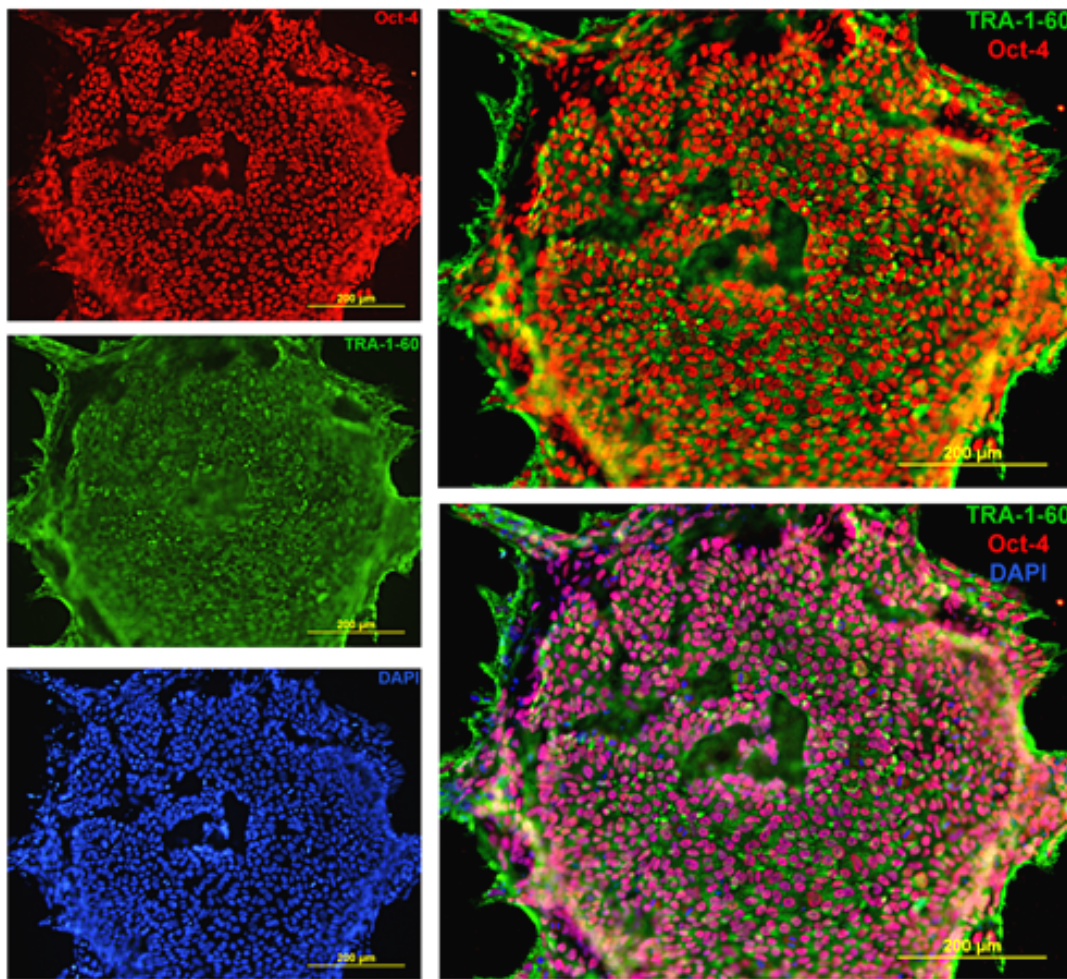


Foto de un Gel de agarosa (Br-Et) mostrando los productos de amplificación por RT-PCR relativos a la detección de los principales genes de pluripotencialidad

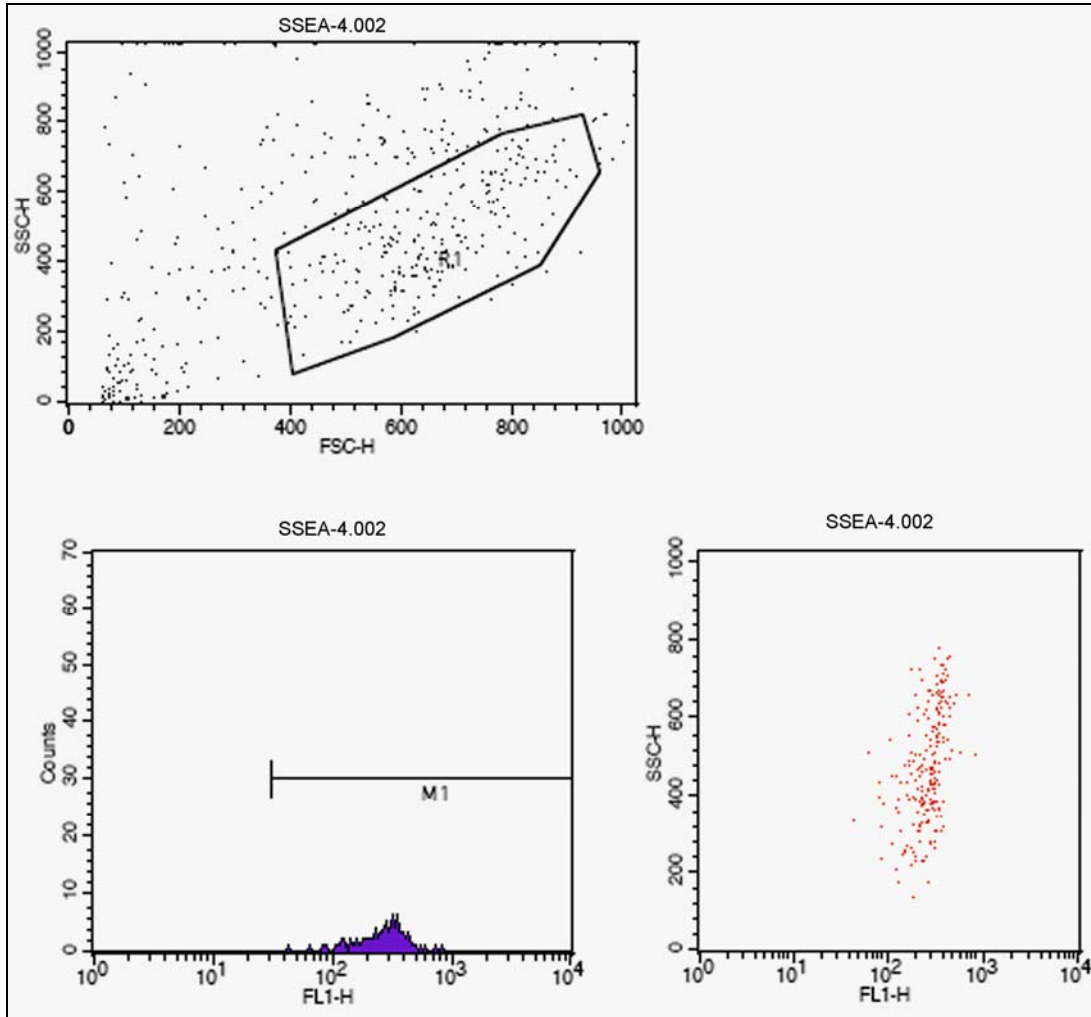
2- Inmunofluorescencia

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

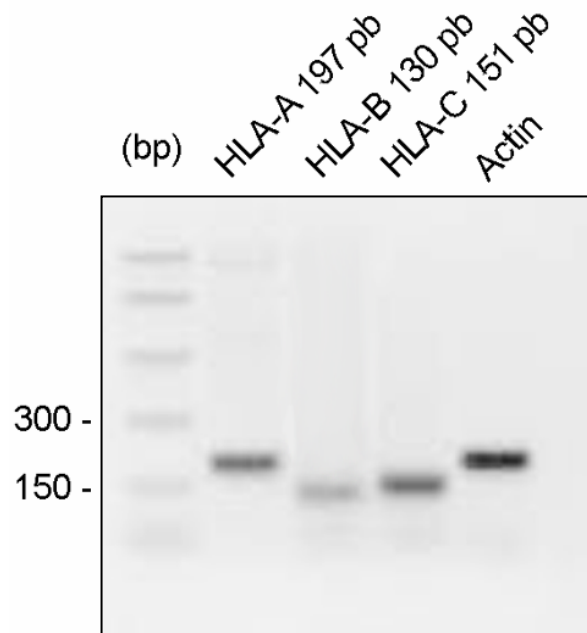
3- Citometría de flujo (SSEA-4)



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

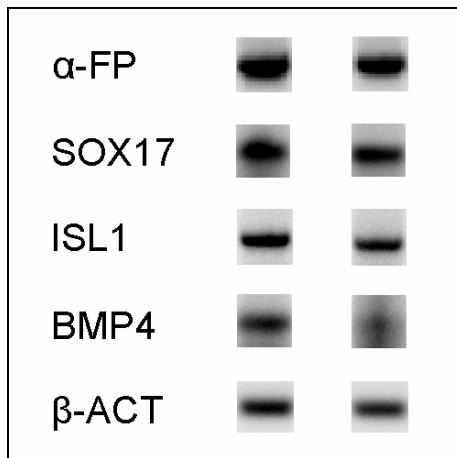
IV.- Expresión HLA



Expresión de los distintos isotipos HLA por RT-PCR

V.- Diferenciación espontánea “in vitro” de HVR-1

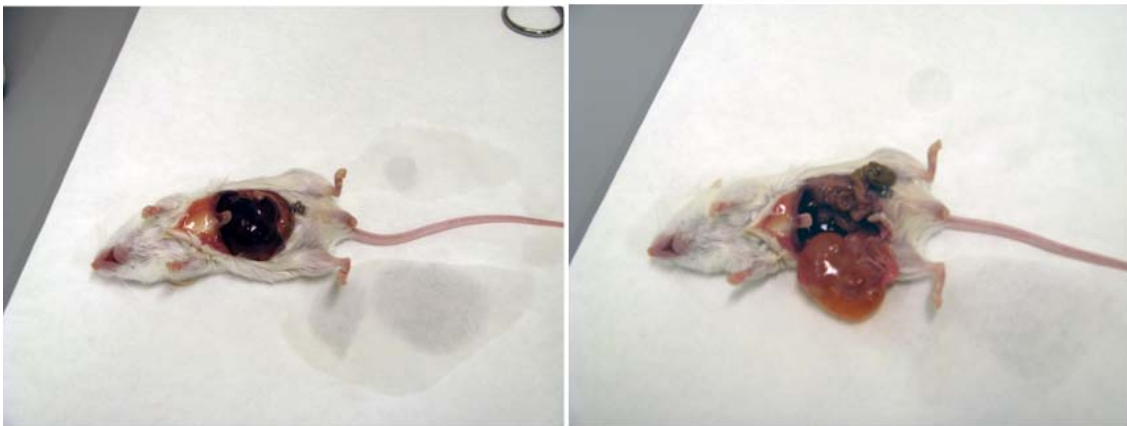
Se llevó a cabo un protocolo de diferenciación espontánea mediante cultivo masivo sobre Matrigel con medio KSR sin hrbFGF. Se realizó cambio de medio en días alternos durante 14 días. A continuación se extrajo ARN para analizar la expresión de algunos marcadores de diferenciación. Los resultados se muestran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

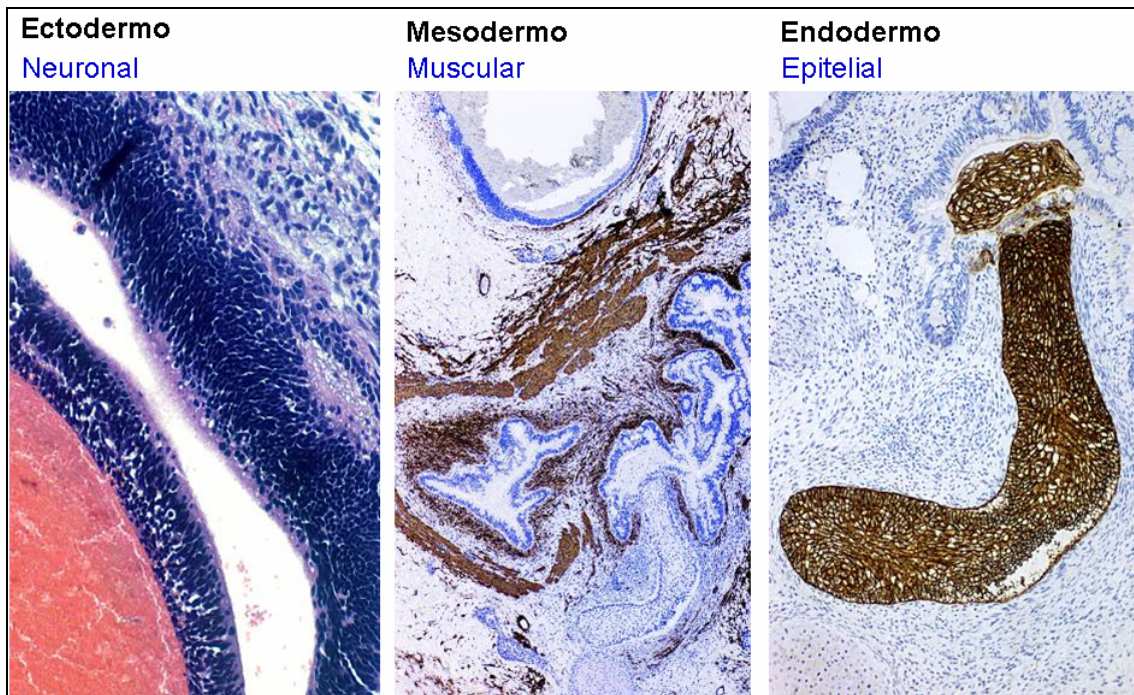
Los ratones inoculados con las CTEhs HVR-1 y que mostraron alteraciones macroscópicas, fueron sacrificados a las 6 semanas de tratamiento. En el proceso de disección pudimos apreciar unas masas globosas (Teratomas con fluido quístico) que fueron utilizadas para un análisis histológico con el fin de detectar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



Extirpación del teratoma de un ratón beige NOD-SCID

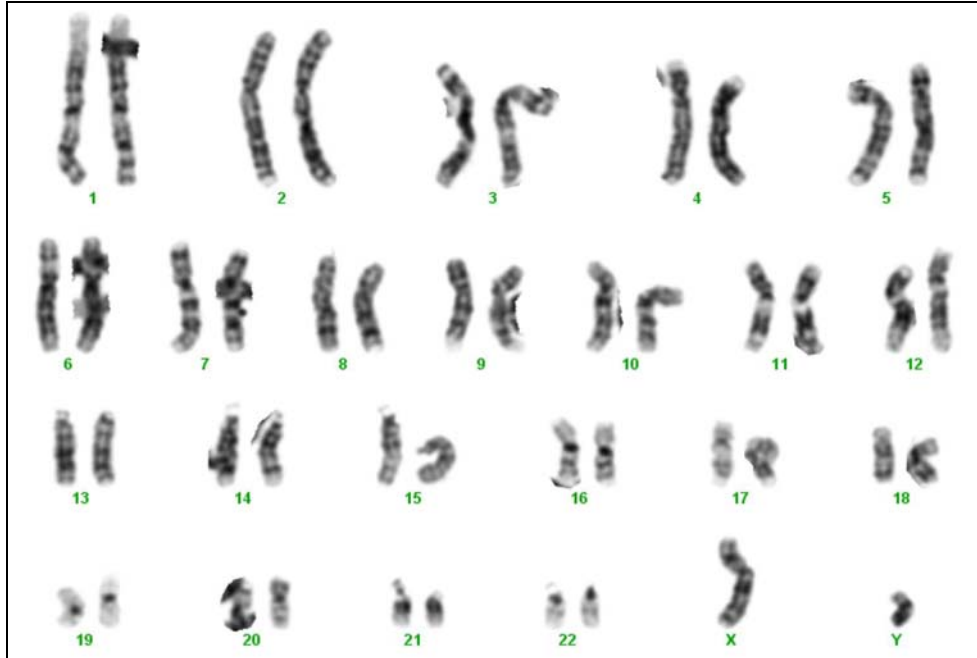


Aspecto del teratoma extirpado



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)

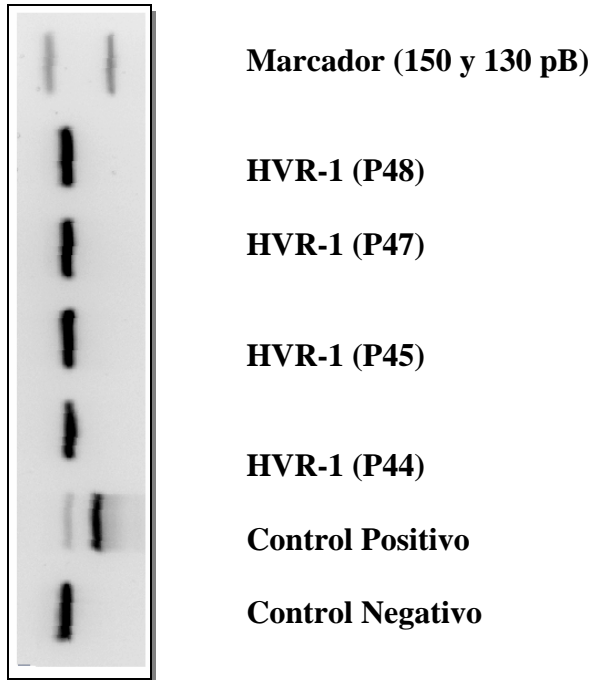
VII.- Test de esterilidad

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 *Mycoplasma* y *Acholeplasma* en cultivos celulares, con las muestras HVR-1. De nuevo, el resultado fue negativo para las muestras.



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

Resumen:

CARACTERIZACION DE LA LÍNEA HVR-1

CARACTERÍSTICAS	
Pase n°	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	+